



**HAL**  
open science

# Régulation de la voie Hedgehog : étude structurale et fonctionnelle de protéines de signalisation

Amira Jabrani

► **To cite this version:**

Amira Jabrani. Régulation de la voie Hedgehog : étude structurale et fonctionnelle de protéines de signalisation. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114813 . tel-00737495

**HAL Id: tel-00737495**

**<https://theses.hal.science/tel-00737495>**

Submitted on 2 Oct 2012

**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.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

## ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

## DISCIPLINE :

Sciences

ANNÉE 2011- 2012

SÉRIE DOCTORAT N 1169

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenu le 11/05/2012

par

**Amira JABRANI**

**Régulation de la voie Hedgehog : Étude structurale et fonctionnelle de protéines de signalisation**

**Directeur de thèse :**

Valérie BIOUS

CR1-CNRS (Paris)

**Composition du jury :**

*Président du jury :*

Sylvie NESSLER

PR-UPS (Orsay)

*Rapporteurs :*

Pascal THEROND

DR-CNRS (Nice)

Isabelle MUS-VETEAU

CR1-CNRS (Nice)

*Examineurs :*

Anne PLESSIS

MCU- UPD (Paris)

Daniel PICOT

DR-CNRS (Paris)

*A mes parents Rekaya et Ahmed*

## **Remerciements**

*Tout d'abord, je remercie les membres du jury : le Professeur Sylvie NESSLER pour avoir accepté de présider la soutenance de ma thèse, le Docteur Pascal THEROND et le Docteur Isabelle MUS-VETEAU pour l'honneur qu'ils me font en jugeant mon travail. Vos remarques et suggestions auront contribué à améliorer la qualité de mon manuscrit. Enfin je remercie le Docteur Anne Plessis et le Docteur Daniel PICOT d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.*

*Je remercie chaleureusement le Docteur Jacqueline CHERFILS de m'avoir accueilli au LEBS et plus particulièrement dans son équipe. Un grand merci pour tes conseils et surtout pour les discussions scientifiques au cours de nos réunions d'équipe. Je suis très contente d'avoir pu travailler avec la plus dynamique des chefs d'équipe et de laboratoire.*

*C'est avec beaucoup de reconnaissance que je souhaite remercier ma directrice de thèse le Docteur Valérie BIOU pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour la formation scientifique de qualité qu'elle m'a apportée et surtout pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ma thèse. Un grand merci aussi pour m'avoir laissé la liberté de diriger mon sujet dans le sens que je désirais. Ta grande rigueur, ton dynamisme et ta passion pour la recherche scientifique m'ont beaucoup appris. Je pars avec un bagage scientifique très enrichi. Un grand merci aussi pour tes encouragements et ton soutien pendant les moments de doute ou de désespoir notamment relatifs à mes papiers. Tu savais trouver les mots pour m'encourager et me motiver. Travailler avec toi et apprendre à tes côtés auront été un plaisir mais surtout un honneur.*

*Je tiens à remercier très chaleureusement l'ensemble de mon équipe : l'équipe 06. Un grand merci aux anciens que je n'oublierai jamais: Jean-Christophe, Alexandra, Sébastien, Bernard, Birguitta, Pumpa et Anna. Une pensée spéciale à Arnaud. Tu es arrivé dans l'équipe après une grande vague de départ. Je garde en mémoire tous les fous rires et les bêtises qu'on a pu faire. Je n'oublierai jamais aussi tes multiples tentatives pour apprendre quelques mots en arabe notamment le fameux « oskot » que tu sortais à tout moment. Merci pour tout.*

*Je remercie tout particulièrement le Docteur Valérie CAMPANACCI pour son aide précieuse qui a contribué sans aucun doute à l'avancement de mon projet. Valy, je garderai toujours en mémoire le soutien moral que tu m'as apporté notamment durant les derniers mois de ma thèse. Travailler avec toi et surtout partager ton bureau pendant toutes ces années restera graver dans ma mémoire à jamais. Je n'oublierai pas tes rires à la limite de l'hystérie, les blagues qui saturent nos boîtes mail et surtout la quantité d'ondes positives que tu envoyais tous les matins en arrivant au labo.*

*Un grand merci à Mahel pour toute l'aide qu'elle m'a apporté depuis le premier jour de mon arrivée au laboratoire. Je te remercie beaucoup pour toutes les discussions scientifiques qu'on a pu avoir, pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta générosité.*

*Mes souvenirs de thèse ne seraient rien sans les moments joyeux et inoubliables partagés avec le clan de choc : Kaheina (Kaka), Audrey, Marcia, Isaline, Lydia et Azaria. Ma kaka adorée, merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble, pour les nuits blanches au Synchrotron, pour ta disponibilité et pour ton aide à tous les niveaux. Surtout ne change pas et je viendrais sans faute te rendre visite en Australie. Ma petite Audrey, notre amitié s'est renforcée de jour en jour et je ne voyais plus le labo comme avant sans toi. Heureusement que moi aussi je suis partie en même temps que toi. Je te remercie de m'avoir écouté dans les moments les plus durs et d'avoir été à mes côtés tout le temps pour m'encourager et me motiver, toujours autour d'un café bien chaud. Notre amitié compte beaucoup pour moi. Marcia, ta bonne humeur et nos fous rires partagés (au Synchrotron par exemple) graveront dans mon esprit ta nature rayonnante. Merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble et je compte sur toi pour jouer les rebelles après moi. Isaline, je suis très contente d'avoir fait ta connaissance, je te remercie également pour ta joie de vivre et ta bonne humeur. Les filles, je garde également en mémoire nos sorties à travers la France et toutes les fois où nous avons pris des verres toujours dans des endroits sympas dénichés par ma petite Audrey,*

*Je tiens à remercier particulièrement mon cher Dominique alias « Hassen », the PostDoc de l'équipe pour toutes les discussions qu'on a eu tout au long de ma thèse. Je t'attends avec impatience à Tunis pour te faire découvrir mon univers que tu redoute tant. Merci pour tous les moments drôles ou pas qu'on a partagé. Tu es le meilleur.*

*Lydia, ma Lyly adorée (hbb), il n'existe pas de mots pour t'exprimer ma gratitude. Nos chemins se sont croisés un beau matin de juillet et tous les jours je me demande ce qu'aurait pu être ma vie sans toi. Je te remercie énormément pour ta joie de vivre, ta bonne humeur, ta disponibilité et pour tous les moments mémorables qu'on a passé ensemble et surtout au téléphone. J'ai trouvé en toi l'écoute d'une confidente, la chaleur d'une sœur et les conseils d'une amie. Je n'oublierai jamais nos crises d'hystérie et nos fous rires tout cela sous le regard bien veillant du fantôme de Pipo. Merci de faire partie de ma vie et je te promets que notre amitié survivra même au-delà des frontières.*

*Je remercie mes autres collègues du laboratoire, Jocelyne, Corinne, Tracy, Pascal (pour les blagues toujours originales), l'ensemble des étudiants du LEBS : Chafika (Kika) je suis très contente d'avoir fait ta connaissance, tu étais pour moi une sœur et une amie sur laquelle je pouvais compter à tout moment, Josef, Lionel, Jérémie, Carla, José, Goran, Moutsé, Manu, Samantha, Yannick, Armelle, Olivier, Samira, Jakub, Sarah et Joaquim. Un grand merci aussi à l'équipe 10 : Aline, Philippe (mon Fliflou), Mélanie et Annélie. Votre arrivée dans le laboratoire et surtout à l'étage a donné un sacré coup de jeune et de dynamisme qui nous manquait cruellement.*

*Je remercie mes amies de toujours, Sélima (Solo), Anissa (Noussa) et Hajoura. Merci les filles pour votre soutien inconditionnel. Un grand merci pour tous les moments magiques qu'on a passé ensemble depuis notre jeune âge et dans lesquels je puise mes forces quand le moral est au plus bas. Solo ma chérie, je ne sais pas ce qu'aurait pu être ma vie sans toi. Merci pour ton soutien, pour ta disponibilité et tes encouragements. Sans toi je crois que je n'aurais jamais pu arriver au bout. Merci d'avoir cru en moi comme d'habitude. Je vous aime toutes !!! Je remercie aussi mes amis de Paris : Nadia, Hedi, Majdi, Zineb, Zeineb, Mehdi et Hamza vous avez été une seconde famille pour moi en France merci pour tout.*

*Une pensée particulière à Kaies. Tu es arrivé dans ma vie à un moment où je ne m'y attendais pas : les derniers mois de ma thèse et ça a changé ma vision des choses. Je te remercie pour tes encouragements, ta disponibilité et ta bonne humeur qui m'ont aidés à surmonter tous les coups durs qui se sont présentés.*

*Mes pensées vont également vers ma famille à Tunis et ici en France, en particulier vers mes cousines adorées Aroua et Zouhira, dont l'aide, la présence et les encouragements au quotidien ont été plus qu'un moteur durant toutes ces années. Un grand merci aussi à mon cousin Walid pour son grand cœur et sa patience avec moi.*

*Un grand merci aussi à mes tontons adorés : Houssine pour ta joie de vivre et ta disponibilité, Mahmoud pour ton soutien et tes encouragements tout au long de mon parcours et Hamadi pour ta bonne humeur et ta gentillesse.*

*Mon parcours n'aurait jamais pu rencontrer le succès sans le soutien à toute épreuve que mes parents m'ont apporté. Il n'existe aucun mot pour traduire ma reconnaissance, mon amour et mon affection. Ces années de thèse ont été très dures à gérer pour notre petite famille, surtout pour toi maman, mais vous étiez toujours là pour m'encourager et me motiver sans jamais se plaindre. Un grand merci à toi maman d'avoir toujours pensé à moi avant même de penser à toi. Un grand merci à toi mon cher papa, sans toi je n'aurais jamais pu arriver jusque-là. Merci de m'avoir poussé et soutenu jusqu'au bout. Un grand merci à mon petit frère Amine (Minouchi) d'avoir pris la relève au près des parents après mon départ. Je t'aime mon Minouchi. Une pensée particulière à ma grande mère (Ommi) pour sa chaleur et ses prières.*

*Je tiens sincèrement à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de cette thèse.*

## ***RESUME***

La voie de signalisation Hedgehog (HH) intervient dans de multiples étapes du développement embryonnaire des mouches aux humains. Chez l'Homme, elle régule l'homéostasie des cellules souches et est impliquée dans le contrôle de la prolifération (Ingham and McMahon, 2001) et la survie cellulaire. L'activation inappropriée de cette voie contribue au développement de nombreuses tumeurs (Rubin and de Sauvage, 2006). Le processus de tumorigénèse peut être dû à des mutations qui engendrent la perte de régulateurs négatifs ou la stimulation d'effecteurs positifs, ou à une réactivation aberrante de la voie de la part des cellules voisines. La dérégulation de la voie HH est ainsi impliquée dans l'apparition de plusieurs cancers touchant les organes dont le développement est régulé par HH : peau, langue, prostate, vessie et pancréas. La régulation de la voie Hedgehog passe par des réseaux complexes d'interactions génétiques et moléculaires, qui sont modulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles. Chez la Drosophile, la régulation de la voie HH passe par un complexe protéique intracellulaire de composition variable et de haut poids moléculaire (jusqu'à 1 MDa) appelé HTC : HH Transducing Complex.

À la surface des cellules répondant au signal HH, les récepteurs membranaires Patched (PTC) et Smoothed (SMO) sont responsables, respectivement, de la perception du signal HH dans le milieu extracellulaire et de la transduction du signal. En absence de signal, le récepteur d'HH, Patched (PTC) inhibe le Récepteur associé aux protéines G trimériques Smoothed (SMO) qui est dégradé; le HTC se déplace le long des microtubules via la kinésine COS2; le facteur de transcription CI est phosphorylé par des protéines kinases (PKA, CKI, GSK3) associées au HTC, conduisant à son clivage partiel par le protéasome (Aza-Blanc et al., 1997) (Wang and Price, 2008). La forme de CI tronquée (CIR) agit comme répresseur transcriptionnel. La fraction non clivée de CI est retenue dans le cytoplasme par COS2 et une protéine dont la fonction précise est inconnue mais dont les mutations sont létales chez les vertébrés, Supresseur of Fused (SUFU). La fixation de HH sur PTC entraîne la levée de son inhibition sur SMO, induit la phosphorylation de ce dernier, son changement de conformation et son accumulation à la membrane plasmique. Le HTC se détache des microtubules, SUFU et COS2 sont phosphorylées (probablement par la kinase Fused (FU) qui est elle-même phosphorylée (Therond et al., 1996)) et enfin, CI est libérée du HTC, et est transportée dans le noyau sous sa forme longue pour activer la transcription des gènes cibles de la voie.

Les données actuelles concernant les interactions au sein du HTC ont été obtenues par des expériences *in vitro* de type «pull-down», par la technique du double hybride chez la levure ou par co-immunoprécipitation à partir d'extraits de cellules ou d'embryons de Drosophile. L'existence de véritables complexes macromoléculaires impliquant FU, COS2, CI, résistant à une colonne de tamis moléculaire et auquel est associé SUFU, a été mise en évidence par co-immunoprécipitation (Robbins et al., 1997) (Stegman et al., 2000). Une dernière protéine appelée myeloid leukemia factor (MLF), très conservée dans tous les organismes et n'ayant pas de similarité avec d'autres, interagit avec CI et SUFU et les entraîne dans le noyau. Les seules études structurales concernant la voie HH ont porté sur les protéines Sonic hedgehog, Indian hedgehog et leurs partenaires extra cellulaires, mais les seules structures existantes concernent les protéines

intracellulaires de la voie HH : le domaine N terminal de SUFU et la région à doigt de zinc de la protéine GLI1.

L'objectif de ma thèse est de définir les bases moléculaires et structurales de la régulation de la voie HH. Plus précisément, je me suis attachée à caractériser par des méthodes structurales et biochimiques les membres du complexe intracellulaire HTC qui contrôlent, chez la drosophile, le devenir du facteur de transcription Ci/GLI. En effet, la Drosophile est un bon modèle pour étudier la régulation de cette voie, car le système HH y est plus simple, et les partenaires et leurs interactions sont remarquablement conservés jusque chez les Mammifères.

Pour cela, les différentes protéines HH ont été clonées dans des vecteurs d'expression bactériens et j'ai réussi à mettre en place les conditions de leur expression et de leur purification. Nous avons pu montrer que la protéine SUFU, un domaine de la kinase FU, la forme répressive du facteur de transcription CI (CI-R), le domaine moteur de la kinésine COS2 et la protéine MLF s'expriment bien en bactéries. Les quantités de protéines obtenues étaient suffisantes pour mener des études biochimiques, enzymatiques et structurales. J'ai ainsi pu caractériser la protéine SUFU en solution par des techniques de Biophysique.

En particulier, mon travail a permis de montrer que SUFU présente une forme allongée en solution, compatible avec sa fonction de protéine échafaudage établissant des interactions avec différents partenaires dans la cellule. J'ai pu mettre en évidence aussi sa phosphorylation *in vitro* par la PKA et par la kinase FU. J'ai aussi pu montrer que les protéines SUFU-MLF interagissent ensemble par des mesures de calorimétrie qui m'ont permis de déterminer une constante d'affinité de l'ordre de 1.5  $\mu$ M. J'ai pu aussi mettre en évidence, d'une part, l'autophosphorylation du domaine kinase de la protéine FU en présence d'ATP. D'autre part, j'ai pu montrer que dans certaines conditions de purification la protéine est co-purifiée avec un acide nucléique (ARN) qui agit directement sur son activité d'hydrolyse de l'ATP. Les résultats préliminaires obtenus pour le domaine moteur de la protéine COS2 montrent que ce domaine s'exprime bien et qu'il possède une activité ATPasique en solution et en absence de microtubule.

J'ai ainsi mis en place les outils moléculaires nécessaires pour identifier des régions importantes dans les interactions protéines-protéines au sein du complexe HTC qui vont permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation du facteur de transcription CI en fonction de l'état d'activation de la voie. Mes travaux ouvrent la voie à de nombreuses études structurales et fonctionnelles de ces protéines jusqu'ici peu étudiées.

Mots clés : Hedgehog, purification, biophysique, interaction, phosphorylation, kinases.



## *Table des Matières*

Liste des Abréviations .....	5
Introduction Générale.....	7
I. La voie HH : Découverte.....	7
II. Voie HH chez la drosophile :.....	9
A. Transduction du signal :.....	9
B. Rôle de la voie HH au cours du développement:.....	11
III. Voie HH chez les vertébrés:.....	12
A. Transduction du signal :.....	12
B. Rôle de la voie HH au cours du développement:.....	15
C. La voie HH et les malformations congénitales :.....	18
D. La voie HH et les Cancers :.....	19
1. Les cancers de Type I :.....	20
2. Les cancers de Type II :.....	21
3. Les cancers de Type III :.....	22
4. Les cancers de Type IV :.....	22
5. Les cancers des cellules souches:.....	22
E. Les inhibiteurs de la voie HH :.....	23
IV. Voie HH : Mécanismes Moléculaires.....	25
A. Synthèse du morphogène HH :.....	25
B. Sécrétion et diffusion du morphogène HH :.....	27
C. Réception du signal HH :.....	29
1. Le récepteur Patched :.....	29
2. Le récepteur Smoothened :.....	31
3. Relation PTC /SMO :.....	33
a. Quel messenger entre PTC et SMO ?.....	33
b. Effet de PTC sur la durée de vie et la localisation de SMO :.....	35
D. Le complexe intracellulaire chez la Drosophile :.....	35
1. La protéine Costal2 :.....	36
2. CI/GLI :.....	38
3. Les protéines kinases :.....	42
a. LA PKA :.....	42
b. La CKI :.....	43
c. La GSK3 $\beta$ :.....	43
d. FUSED :.....	44
4. SUFU :.....	47
a. Interactions :.....	48
b. Structure cristalline :.....	50
c. Régulation de SUFU :.....	50
5. MLF :.....	51
a. Localisation cellulaire :.....	51
b. Fonctions :.....	52
c. Interaction avec SUFU.....	53
V. La Voie HH : Caractérisation Structurale :.....	53
VI. Projet de thèse :.....	56

Matériels et Méthodes .....	58
I. Expression et purification de protéines recombinantes dans les cellules <i>Sf21</i> : .....	58
A. Transfection des cellules et obtention des stocks viraux : .....	59
B. Titration du stock viral : .....	60
C. Test d'expression : .....	61
D. Culture : .....	62
1. Culture des protéines seules : .....	62
2. Co expression FU/COS2 : .....	62
E. Purification : .....	62
1. Purification COS2 : .....	62
2. Purification FU : .....	63
3. Purification de la Coexpression FU et COS2 : .....	63
II. Clonage, Expression et Purification des protéines exprimées chez <i>E. Coli</i> : .....	64
A. Clonage Gateway : .....	64
1. 1 <sup>ère</sup> Réaction de clonage : .....	66
2. 2 <sup>ème</sup> Réaction de clonage: .....	67
B. Clonage Gateway pour coexpression MLF-SUFU : .....	67
C. Clonage Classique : .....	70
D. Mutagenèse Dirigée : .....	71
E. Expression des protéines recombinantes : .....	73
1. Analyse des fractions protéiques par Electrophorèse en conditions dénaturantes: .....	73
2. Test d'expression : .....	73
3. Arrêt des cultures et analyse sur gel : .....	74
4. Surexpression des protéines: .....	75
F. Purification des protéines : .....	75
1. Colonne d'affinité: .....	75
2. Colonne d'exclusion moléculaire: .....	77
3. Colonne échangeuse d'ions: .....	77
G. Mesure de la concentration des protéines purifiées: .....	79
H. Phosphorylation de SUFU par les extraits de cellules: .....	79
I. Détection par Western Blot : .....	82
III. Analyses Biophysiques : .....	84
A. Analyse de la structure en solution par dichroïsme circulaire.....	84
1. Dichroïsme circulaire avec le dichrographe JASCO : .....	84
2. Dichroïsme circulaire sur DISCO : .....	84
B. Calorimétrie : .....	85
C. Mesure Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) : .....	86
D. SEC-MALLS : .....	87
IV. Mesure d'activité kinase : .....	89
A. Réaction couplée à la PK/LDH : .....	89
B. Mesure en luminescence : .....	90
V. Étude structurale : Tests de cristallisation.....	91
Résultats.....	93
I. Production de protéines en Cellules d'insectes : .....	93
A. Production de la protéine Costal2 : .....	93
1. Test d'expression : .....	93
2. Expression et Purification : .....	94

3.	Caractérisation de COS2 par Dichroïsme Circulaire :	95
B.	Production de la protéine FUSED :	97
C.	Coexpression des protéines FUSED et Costal2 :	98
II.	Production en Bactéries :	100
A.	Caractérisation de la protéine FUSED :	100
1.	Expression-Purification de FUSED sauvage :	100
a.	Expression :	100
b.	Purification du domaine kinase :	102
2.	Expression- Purification des mutants :	104
3.	Caractérisation de l'autophosphorylation de FUSED :	104
4.	FUSED fixe l'ARN :	107
a.	Mise en évidence de la présence d'un Acide nucléique :	107
b.	Identification de l'ARN :	109
c.	Effet de la fixation de l'ARN sur l'activité de FU :	109
d.	Analyse en dichroïsme circulaire sur FU avec et sans ARN :	110
B.	Caractérisation de la protéine SUFU :	112
1.	Expression et caractérisation Biophysique :	112
a.	Résumé de l'article :	112
b.	Article :	115
2.	Résultats supplémentaires concernant SUFU :	138
a.	Analyse de la séquence de SUFU :	138
b.	SUFU fixe les cations :	139
c.	Phosphorylation de SUFU :	141
d.	Interaction FUSED-SUFU :	146
C.	Caractérisation de la protéine MLF :	147
1.	Clonage et Expression :	148
2.	Analyse de la séquence de MLF et définition de nouveaux domaines :	148
3.	Clonage, Expression et purification des différentes constructions :	150
4.	Interaction MLF-SUFU :	152
D.	Coexpression des protéines MLF et SUFU :	154
1.	Clonage :	154
2.	Expression :	155
3.	Purification du complexe SUFU-MLF :	156
E.	Autres protéines de la voie HH :	159
1.	La partie C-terminale du récepteur Smoothened :	159
a.	Expression-Purification:	159
b.	Caractérisation en solution:	160
2.	La Protéine CI sous sa forme répressive (CI-R) :	161
a.	Clonage-Expression:	161
b.	Purification:	162
c.	Interaction avec SUFU:	163
3.	La Protéine COSTAL 2:	165
a.	Clonage-Expression du domaine Moteur de COS :	165
b.	Purification:	167
c.	Caractérisation en solution par Dichroïsme Circulaire :	167
d.	Activité ATPasique du domaine Moteur de COS2:	169
III.	Essais de cristallisation :	170

Discussion .....	172
I. FUSED :.....	172
A. Modélisation du domaine kinase de FUSED :.....	173
B. Caractérisation de l'autophosphorylation du domaine kinase :.....	176
1. Activité de la protéine FU sauvage :.....	176
2. Activité des mutants de FU : .....	176
3. Mécanisme d'autophosphorylation :.....	177
4. Le domaine kinase de FU fixe L'ARN :.....	177
II. SUFU :.....	180
A. Caractérisation de SUFU en solution :.....	181
B. SUFU fixe les cations :.....	182
III. Interaction SUFU-MLF : .....	183
Conclusions et Perspectives .....	185
Bibliographie.....	188

## Liste des Abréviations

A : Antérieur  
aa : acides aminés  
Abs: Absorbance  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine Diphosphate  
ARN : Acide ribonucléique  
ATP : Adénosine Triphosphate  
 $\beta$ -TRCP : *Beta-transducin repeat-containing protein*  
BCC : Carcinome Basal Cellulaire  
CDO/BOC : *Cell adhesion molecule-related downregulated by oncogenes/Brother of CDO*  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
Cal : calorie  
CD : Dichroïsme circulaire  
CI : Cubitus interruptus forme activatrice (155 kDa)  
CI-R : CI forme Répressive (75 kDa)  
CKI : Caseine Kinase I  
Col : Collier  
COS2 : Costal 2  
CSC : Cellules souches cancéreuses  
CTD : partie C-Terminale intracellulaire de PTC  
C-terminal : Carboxy-terminal  
D : Dorsal  
Dhh: Desert Hedgehog  
DISP : Dispatched  
DO: Densité Optique  
dMLF : MLF de drosophile  
DTM : Domaine transmembranaire  
DTT: Dithiothréitol  
EFG: Epidermal Growth Factor  
En : Engrailed  
FU : FUSED  
GLI : Glioma associated oncogenes  
GLI-R : forme répressive de GLI  
GNPs: Granule Neuron Precursors  
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3  
GST : Glutathion S-transférase  
Hhip: Hedgehog Interacting Protein  
*hh* : Gène Hedgehog  
HH-N : protéine HH partie N-terminale  
HH-C : protéine HH partie C-terminale  
HSPG : Heparane Sulfate Protéoglycane  
HTC : Hedgehog Transducing Complex  
ICSN : Institut de Chimie des Substances Naturelles.  
IHH : Indian Hedgehog  
IHOG: interference hedgehog

IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside.  
ITC: Isothermal titration calorimetry  
K: Kelvin  
KCl: Sodium Chlorure  
kDa: kilo dalton.  
KIF : *Kinesin family member*  
LB: Luria Broth  
Mdeg: millidegrés  
min: minute  
MLF: Myeloid Leukemia Factor  
MOI : Multiplicity Of Infection  
Mol: molaire  
MW : Masse moléculaire  
N-terminal : amino-terminal  
NaCl: Chlorure de Sodium.  
NPC1 : Niemann Pick C1  
P : Postérieur  
pb : paire de base  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PDB : Protein Data Bank  
pI: point isoélectrique.  
PEG : polyéthylène glycol.  
PKA : Protéine Kinase A  
Ptc : Patched  
RND : Resistante Nodulation Division  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis  
Sec: seconde  
SHH: Sonic Hedgehog  
SHHN: Domaine amino-terminal de Sonic Hedgehog  
SLIMB : *Supernumerary limbs*  
SMO: Smoothened  
SNC système nerveux central  
SUFU : Suppresseur de Fused  
TEV : Tobacco Etch Virus  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
Tpm : tour par minute  
U : unité  
UV: Ultra Violet  
2YT: Yeast Triptone

# ***INTRODUCTION GENERALE***

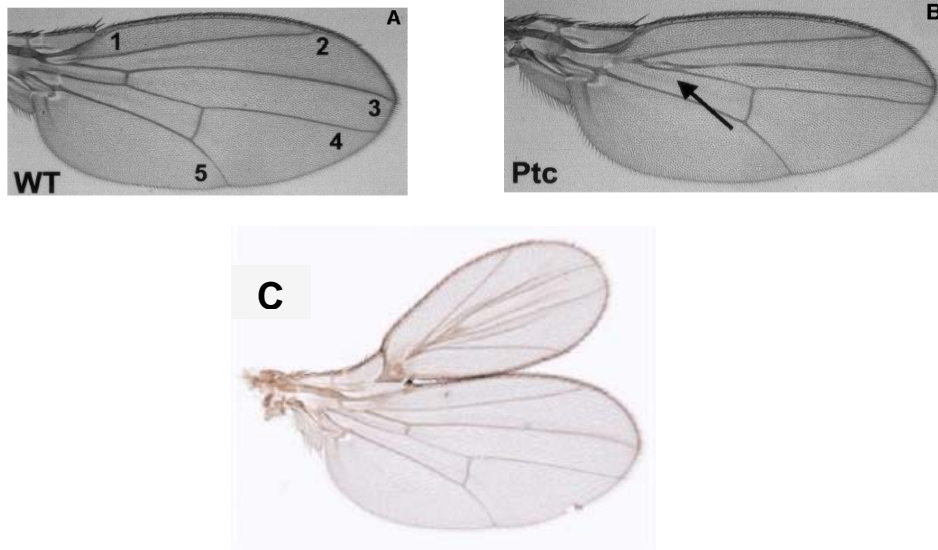
## ***Introduction Générale***

### **I. La voie HH : Découverte**

Les premiers éléments de la voie de signalisation HH ont été mis en évidence à partir de criblages génétiques réalisés chez la drosophile. Le gène Hedgehog (HH), qui signifie hérisson en anglais, a été identifié pour la première fois lors d'un criblage de mutations interrompant le patron des larves de drosophiles et fait référence au phénotype d'un mutant présentant une surface épineuse visible au microscope (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). De nombreux arguments génétiques ont fortement suggéré que la protéine HH pouvait agir comme un signal intercellulaire qui contrôle la prolifération des cellules et détermine leur devenir (Lee et al., 1992) (Mohler and Vani, 1992) (Tabata et al., 1992), ce qui fut confirmé par la suite lors du clonage du gène (Ingham and McMahon, 2001; Marti and Bovolenta, 2002). Rapidement, les orthologues de HH ont été isolés chez la souris et l'Homme ((Echelard et al., 1993) (Chang et al., 1994) (Ekker et al., 1995a; Ekker et al., 1995b) (Marigo et al., 1995) (Riddle et al., 1993; Roelink et al., 1994). Trois homologues de cette molécule ont été identifiés chez les vertébrés (Echelard et al., 1993). Deux d'entre eux ont été nommés d'après des races de hérissons (Desert Hedgehog : DHH ; Indian Hedgehog : IHH), et le troisième Sonic Hedgehog (SHH) vient du nom d'un personnage de jeux vidéo (Burglin, 2008).

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont établi l'importance de la signalisation HH dans plusieurs processus fondamentaux chez les métazoaires. Elle est impliquée dans la polarisation des segments de la drosophile et le contrôle la prolifération, la survie et la différenciation de plusieurs régions lors du développement embryonnaire (Figure 1). La voie de signalisation HH est conservée et joue un rôle important dans le développement embryonnaire chez de nombreuses espèces (Lee et al., 1992). Les protéines HH sont décrites comme morphogènes qui peuvent induire d'une manière dose dépendante le devenir de plusieurs tissus cellulaires ou comme mitogènes régulant la prolifération cellulaire, ou encore comme des facteurs d'induction contrôlant la forme des organes en développement (Ingham and McMahon, 2001).





**Figure 1: Effet de la dérégulation de la voie HH sur la formation de l'aile de drosophile.** (A) Aile sauvage. (B) Aile où la voie HH est inhibée par une surexpression de PTC. La surexpression de PTC entraîne une perte dans la morphologie et la différenciation des veines à la base de l'aile.(C) Aile où la voie HH est activée avec surexpression de Hedgehog. ( Adapté de : (Basler and Struhl, 1994; Johnson et al., 2002).

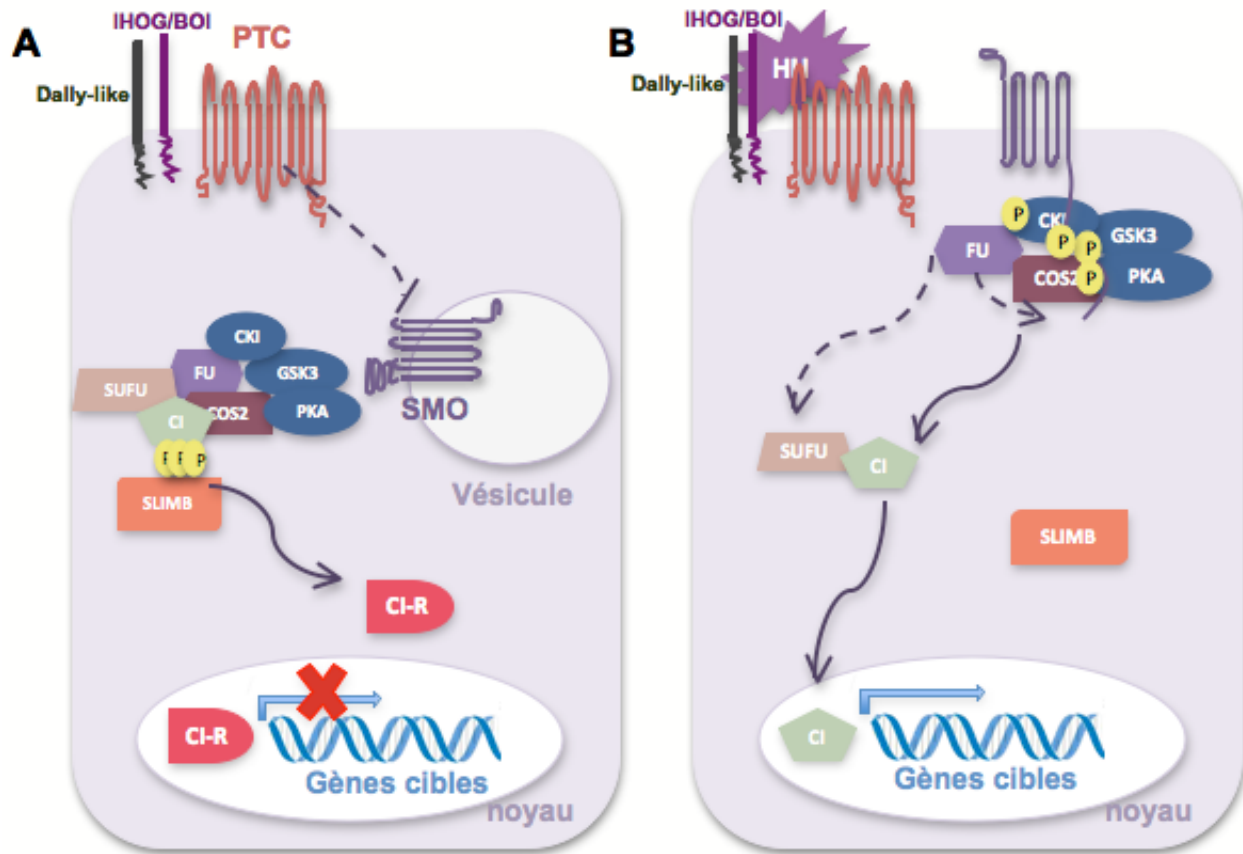
La fonction cruciale de cette voie de signalisation lors du développement est confirmée par les conséquences dramatiques sur les fœtus humains en cas de défauts dans l'activation de la voie. Ces fœtus montrent des malformations congénitales sévères dues aux défauts de développement du cerveau comme l'holoprocéphalie et la cyclopie (Rubin and de Sauvage, 2006); (Belloni et al., 1996). Chez l'adulte, la voie reste active et est impliquée dans le maintien de l'homéostasie des tissus, dans le renouvellement continu et la réparation des tissus adultes et dans l'entretien des cellules souche (Hooper and Scott, 2005).

## **II. Voie HH chez la drosophile :**

### **A. Transduction du signal :**

Tous les détails du mécanisme de transduction du signal ne sont pas complètement élucidés. Les mécanismes moléculaires de production, transport et transduction du signal HH ont été caractérisés chez la drosophile, grâce aux nombreux outils génétiques développés chez ce modèle. En effet, le morphogène HH est une protéine sécrétée qui subit plusieurs modifications post- traductionnelles, au cours de sa synthèse, afin d'être active (Lee et al., 1994; Pepinsky et al., 1998; Porter et al., 1996). Il a été montré par la suite, que ce mécanisme est essentiellement conservé chez plusieurs organismes modèles.

À la surface des cellules répondant au signal HH, les récepteurs membranaires Patched (PTC) et Smoothed (SMO) sont responsables de la réception du signal HH dans le milieu extracellulaire et de sa transduction (Figure 2). En l'absence du ligand HH à la surface cellulaire, PTC réprime SMO qui est localisé dans des vésicules (Nakano et al., 2004) et la voie est inactivée. Dans ces conditions, le facteur de transcription Cubitus interruptus (CI) se retrouve séquestré dans un large complexe cytoplasmique appelé HTC (Hedgehog Transducing Complex), incluant les protéines : Costal2 (COS2), Fused (FU) et Suppresseur de Fused (SUFU), empêchant ainsi son entrée dans le noyau. Il est d'abord phosphorylé par la Protéine Kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA), ce qui entraîne ensuite la phosphorylation sur des motifs adjacents par deux autres sérines /thréonine kinases, la Caséine Kinase I (CKI) et la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3). Ces résidus phosphorylés sont reconnus par la protéine à F-Box SLIMB, qui appartient au complexe Skp/Cullin/F-box (SCF). Ces protéines sont capables d'interagir avec différents substrats grâce à leur motif structural WD-40 et de dicter la spécificité de la dégradation par le protéasome (Deshaies, 1999) (Rogers et al., 2009). SLIMB permet ainsi la catalyse de l'ubiquitination de CI et entraîne son adressage vers le protéasome et son clivage partiel en une forme appelée CI-R (CI-Répresseur) (Jiang and Struhl, 1998). La forme répressive du facteur de transcription est ensuite transportée dans le noyau où elle empêche l'expression de certains gènes cibles de la voie HH. Une fraction non clivée du facteur de transcription Ci reste associée à SUFU dans le cytoplasme (Methot and Basler, 2000).



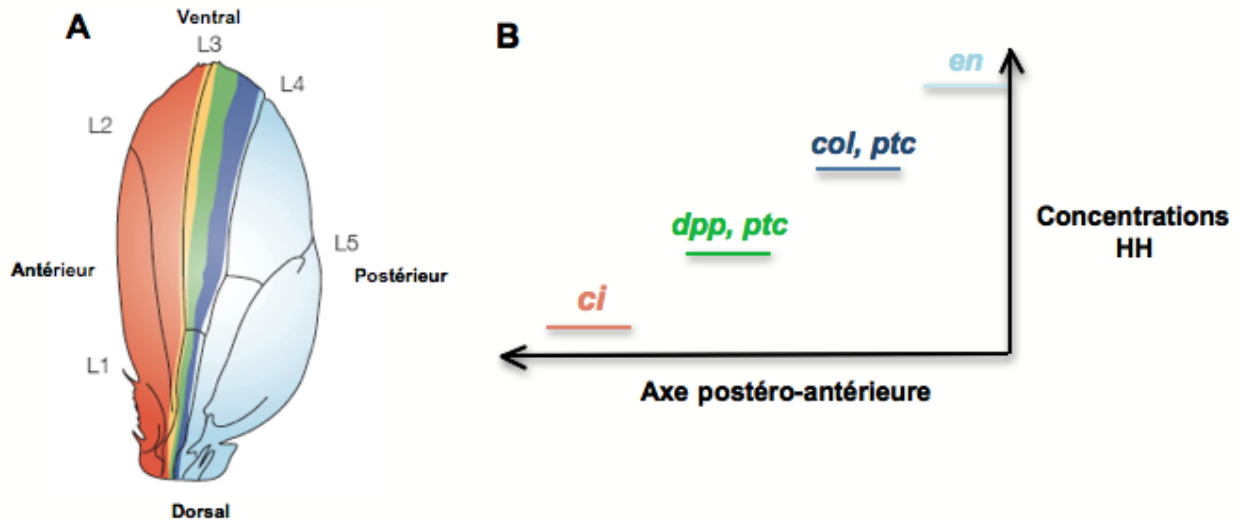
**Figure 2: Représentations schématiques de la voie de signalisation Hedgehog chez la drosophile.** (A) en absence de ligand HH (voie inactive) le récepteur PTC inhibe SMO (flèche en pointillés) qui se trouve essentiellement dans des vésicules ; CI est recruté par COS2 dans le complexe HTC et phosphorylé par les protéines kinases (PKA, CKI, GSK3) associées au complexe entraînant l'apparition de signal de reconnaissance par la protéine SLIMB qui va ubiquitiner la partie C-terminale de CI, conduisant à son clivage partiel par le protéasome pour libérer sa forme répressive (flèche pleine). Le CI-R sera transporté dans le noyau où il va agir comme répresseur transcriptionnel. (B) en présence du ligand HH (voie active) La fixation de HH sur PTC entraîne la levée de son inhibition sur SMO, induit la phosphorylation de ce dernier, son changement de conformation et son accumulation à la membrane plasmique. Le HTC se détache des microtubules, SUFU, FU et COS2 sont phosphorylées (flèches en pointillés) et enfin, CI est libéré du HTC, et est transporté dans le noyau sous sa forme longue (flèche pleine) pour activer la transcription des gènes cibles de la voie. La fraction non clivée de CI est retenue dans le cytoplasme par la protéine SUFU.

Lorsque HH se fixe à PTC, l'inhibition de SMO est levée, permettant ainsi la transduction du signal (Figure 2B). SMO subit des modifications conformationnelles qui seront communiquées dans le cytoplasme grâce au complexe HTC. En effet, SMO est phosphorylé dans sa partie C-terminale intracellulaire par les kinases PKA et CK1 (Denef et al., 2000) (Zhang et al., 2004), ce qui entraîne son accumulation à la membrane. COS2 est lui aussi phosphorylé (voir partie COS2). Ces événements vont entraîner la libération de CI sous sa forme entière et active (CI-A). Cela va conduire à l'accumulation de CI-A dans le noyau et à l'activation de l'expression des gènes cibles de la voie HH. CI entier n'a pas sa pleine activité de transcription. Son activation complète dans le noyau passe par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé (Aza-Blanc et al., 1997) (Ohlmeyer and Kalderon, 1998).

## **B. Rôle de la voie HH au cours du développement:**

Chez la drosophile, HH est indispensable durant le développement. Elle contrôle la polarité des segments embryonnaires (Lee et al., 1992; Mohler, 1988; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980), la morphogenèse de l'aile (Basler and Struhl, 1994; Mohler, 1988; Tabata and Kornberg, 1994), de la patte (Diaz-Benjumea et al., 1994) et du disque d'œil (Dominguez, 1999; Heberlein et al., 1995).

L'importance de la signalisation HH a été bien étudiée dans la morphogenèse de l'aile de drosophile (Figure 3). Le disque imaginal d'aile est un double épithélium qui est formé deux compartiments : antérieur (A) et postérieur (P). Le compartiment P exprime et sécrète la protéine HH. Ce compartiment ne peut pas lui-même répondre au signal HH, car ses cellules n'expriment pas le facteur de transcription CI. Les cellules du compartiment A, les plus proches de la frontière A/P vont réceptionner la protéine HH sécrétée parce qu'elles expriment le récepteur PTC, ce qui va induire l'expression des gènes cibles de la voie tels que les gènes *ptc*, *collier (col)*, *decapentaplegic (dpp)* et *engrailed (en)* et spécifier la différenciation des veines et la croissance de l'aile adulte (Hooper and Scott, 2005). En effet, CI doit son nom à l'effet de la mutation dans le gène qui provoque des malformations des veines quatre et cinq de l'aile (ou veines cubitales) due à l'expression inappropriée du produit CI dans le compartiment postérieur de disque imaginal de drosophile (Orenic et al., 1987).



**Figure 3: Importances de la voie HH dans la formation de l'aile de drosophile et le développement des veines.** (A) HH est sécrétée par les cellules de la partie postérieure du disque imaginal de l'aile alors que PTC est produite uniquement par les cellules de la partie antérieure. Ces dernières répondent en fonction de la concentration de HH en activant la transcription de gènes cibles qui contrôlent la croissance et la morphologie de l'aile. (B) Les gènes *col*, *ptc* et *dpp* sont exprimés à forte ou moyenne concentration de HH. En absence de HH, les cellules expriment CI qui s'accumule sous sa forme répressive (d'après (Hooper and Scott, 2005)).

### III. Voie HH chez les vertébrés:

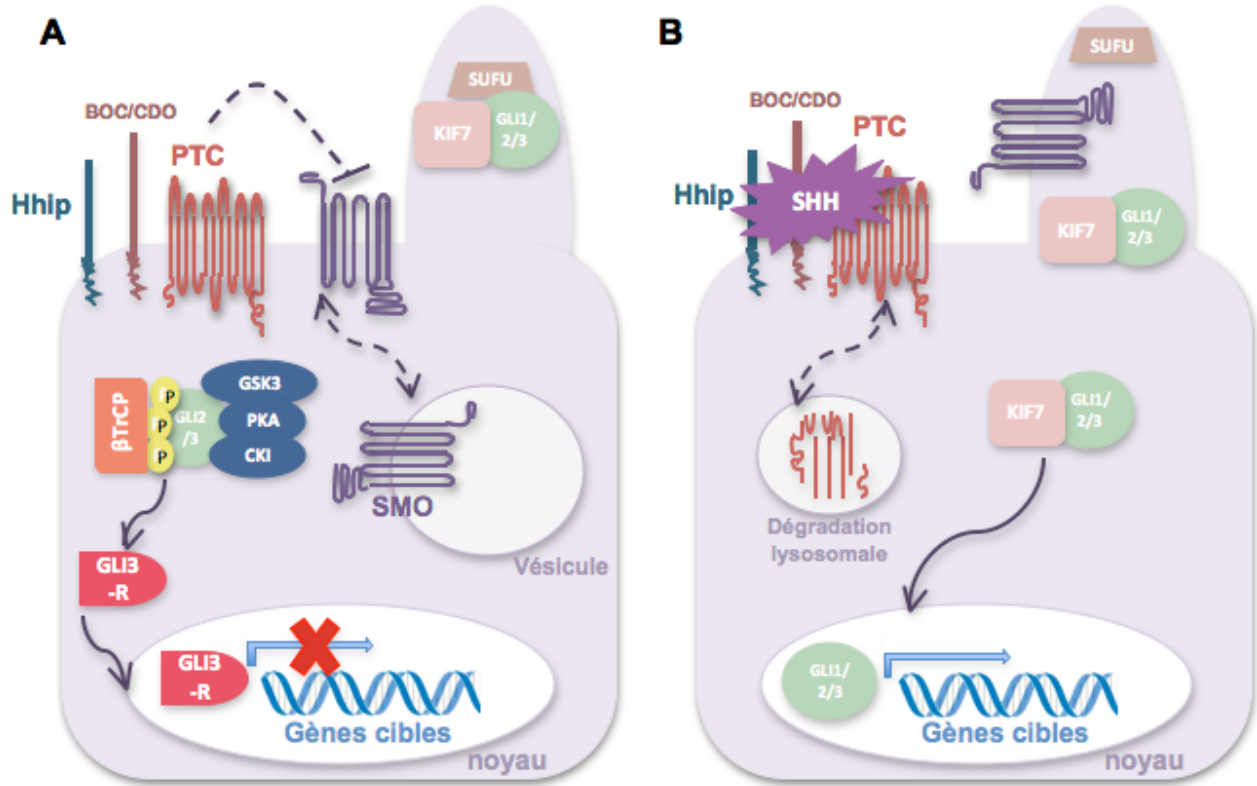
#### A. Transduction du signal :

Il a été montré que la voie de signalisation HH est bien conservée entre la drosophile et les mammifères, cependant il est clair que la voie a gagné en complexité et que l'élimination de certains des composants a des effets différents selon les organismes (Chen et al., 2005) (Svard et al., 2006). En outre, certaines protéines comme le ligand HH et le facteur de transcription sont présentes sous plusieurs isoformes chez les mammifères. Le tableau 1 permet de comparer les différents membres de la voie HH chez la drosophile et leurs homologues chez les mammifères. La différence majeure dans la transduction du signal HH est la dépendance chez les mammifères de la présence de cils primaires (Figure 4). Ces organelles, très riches en microtubules, sont présentes chez plusieurs organismes métazoaires supérieurs mais ostensiblement absents de la drosophile.

Gène chez la Drosophile	Gène chez l'Homme	Fonction	Conservé	Type de Protéine
<i>Hedgehog (hh)</i>	<i>Shh ,Ihh, dhh</i>	Ligand	Oui	Possède un domaine Intéine
<i>Patched (ptc)</i>	<i>ptc1, ptc2</i>	Réception du signal et inhibition de Smoothened	Oui	Récepteur à 12 domaines transmembranaires
<i>Smoothened (smo)</i>	<i>smo</i>	Transduction du signal	Oui	Récepteur à 7 domaines transmembranaires de la famille des GPCR
<i>Costal2 (cos2)</i>	<i>kif27 kif7</i>	Transduction du signal Interaction avec CI/GLI ; membre du HTC	Oui	Kinésine
<i>Fused (fu)</i>	<i>fu</i>	Phosphorylation de COS2 et SUFU ; membre du HTC	Fonction non conservée	Sérine-thréonine Kinase
<i>Suppresseur de fused (sufu)</i>	<i>sufu</i>	Stabilisation de CI/GLI ; membre du HTC	Oui	-
<i>Cubitus interruptus (ci)</i>	<i>Gli1, Gli2, Gli3</i>	Activateur ou répresseur de la voie ; membre du HTC	Oui	Facteurs de transcription
<i>Pka Cki gsk3<math>\beta</math></i>	<i>Pka Cki gsk3<math>\beta</math></i>	Phosphorylation de CI/GLI, SUFU, SMO	Oui	Sérine-thréonine Kinases
<i>slimb</i>	<i>B-trcp</i>	Ubiquitination	Oui	Ubiquitine ligase
<i>dmlf</i>	<i>hmlf1 hmlf2</i>	Suppresseur de polyQ ; interaction avec SUFU	Oui	-

**Tableau 1 :** Comparaison entre quelques membres de la voie HH chez la drosophile et chez l'homme (adapté de (Wilson and Chuang, 2010)).

Dans les cellules mammifères, la fixation de HH sur son récepteur PTC, entraîne la migration de SMO dans l'axonème du cil primaire, suivie par l'accumulation du complexe GLI-SUFU au niveau du sommet du cil. Cette translocation permet de faciliter la dissociation du complexe intracellulaire en réponse à l'activation de SMO et la translocation de la forme entière active de GLI dans le noyau.



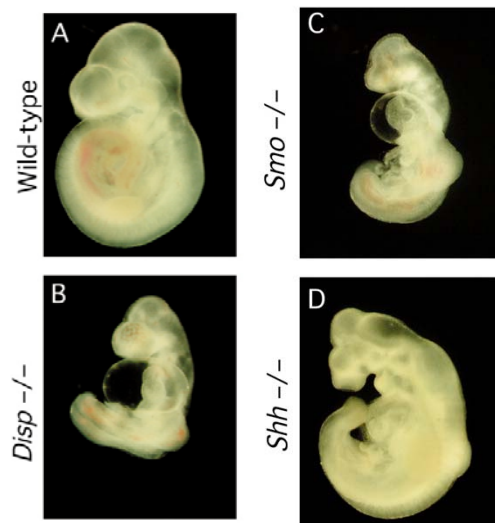
**Figure 4: Représentations schématiques de la voie de signalisation SHH chez les vertébrés.** L'activation correcte de la voie SHH chez les mammifères nécessite la présence des cils primaires. (A) Lorsque la voie est inactive, le récepteur PTC inhibe la protéine membranaire SMO (trait en pointillé) qui sera internalisé dans des vésicules (flèche en pointillé). Les facteurs de transcription GLI sont associés à SUFU. GLI3 est clivée puis libérée sous sa forme répressive après sa phosphorylation par des protéines kinases puis ubiquitination par la protéine culine associée à la  $\beta$ -TrCP. GLI-R (GLI2 et GLI3) est alors transporté dans le noyau pour inhiber l'expression des gènes cibles (flèches pleines). (B) Lorsque le morphogène HH se fixe à son PTC. L'inhibition de SMO par PTC est levée entraînant son accumulation dans le cil primaire. Le récepteur PTC sera alors dégradé dans des vésicules (flèche en pointillé). Le complexe GLI/SUFU est dissocié permettant au facteur de transcription sous sa forme active de migrer dans le noyau pour l'expression des gènes cibles de la voie HH (flèche pleine) adapté de (Wilson and Chuang, 2010).

Chez les vertébrés, les protéines de surface cellulaire Gas1 et Hhip (Hedgehog interacting protein) sont capables de lier le morphogène HH et de réguler la voie HH positivement et négativement, respectivement. La transcription de Hhip, comme celle de PTC, est dépendante de l'activation de la voie HH. En effet, l'expression de Hhip dans les cellules épithéliales de souris atténue leur réponse pour SHH, montrant ainsi que Hhip est un antagoniste de la voie de

signalisation Hedgehog. La protéine Hhip assure donc un rétrocontrôle négatif de cette voie de signalisation en séquestrant SHH à la surface de cellule et en limitant sa migration vers des cellules plus éloignées (Chuang and McMahon, 1999). Il n'existe pas d'homologue identifiable de Hhip et Gas1 chez la drosophile.

## B. Rôle de la voie HH au cours du développement:

Chez les Vertébrés, la voie HH est nécessaire au développement de nombreuses structures pendant l'embryogenèse (Figure 5).

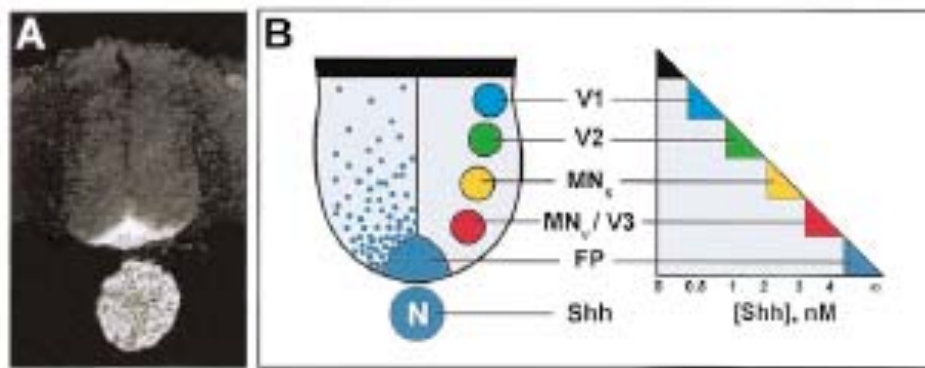


**Figure 5: Effets de la dérégulation de la voie de signalisation HH chez l'embryon de souris à 9.5 dpc (day post coitum).** (A) Embryon sauvage. (B) Embryon homozygote mutant pour *Dispatched*. (C) Embryon homozygote mutant pour *Smoothened*. (D) Embryon homozygote mutant pour *shh*. (D'après (Kawakami et al., 2002)).

SHH est le ligand le mieux connu, car il est le plus exprimé dans l'organisme tandis que l'expression d'IHH et DHH est très localisée. Pendant l'embryogenèse des Vertébrés, DHH régule le développement des cellules germinales des testicules et de l'enveloppe des nerfs périphériques alors qu'IHH joue un rôle dans le contrôle de la croissance cartilagineuse et osseuse (développement des os longs) (Chuang and McMahon, 1999). Dans l'embryon précoce

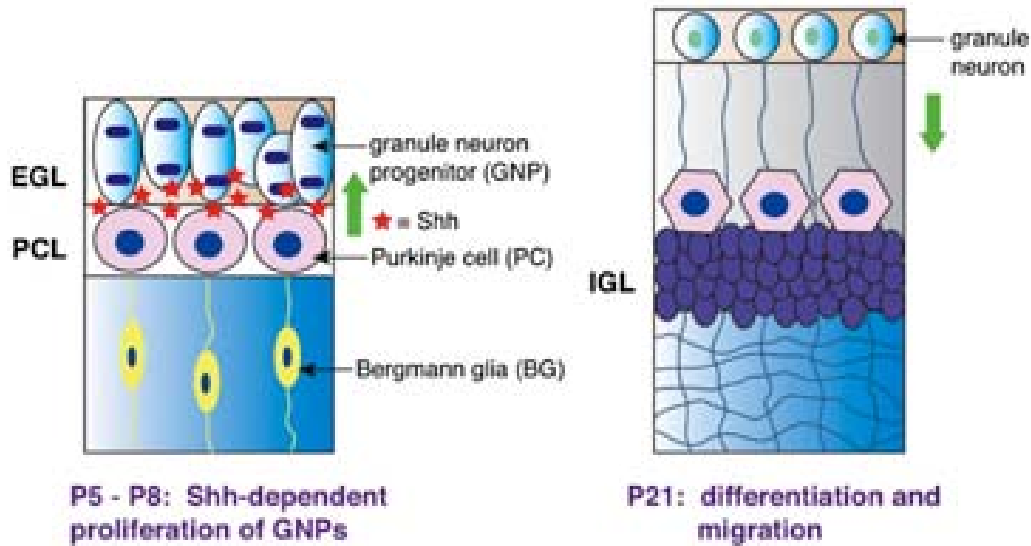


SHH est surtout exprimée dans le nœud, la notochorde, la plaque neurale et dans la zone d'activité polarisante au niveau du bourgeon des membres (Chang et al., 1994) (Johnson et al., 1994). SHH régule la polarité dorso-ventrale du tube neural, la différenciation antéro-postérieure et l'asymétrie droite-gauche des membres (Dale et al., 1997; Riddle et al., 1993). Le modèle le mieux caractérisé pour l'activité de SHH est la spécification neuronale du système nerveux central (Liem et al., 2000) (Patten and Placzek, 2000). Pendant la formation du tube neural, SHH diffuse de la notochorde vers la plaque neurale, créant un gradient de concentration (Figure 6).



**Figure 6: Rôle de la voie HH dans la formation du système nerveux central chez les vertébrés.** (A) SHH est exprimé par les cellules de la notochorde (N) et de la plaque neurale (FP) chez la souris. (B) SHH agit comme morphogène qui, grâce à un gradient de concentration, va induire la différenciation de plusieurs types neuronaux le long de la ligne médiane ventrale (D'après (Briscoe and Ericson, 1999)).

Ce gradient permet de déterminer cinq domaines dans le tube neural exprimant des cibles transcriptionnelles spécifiques qui déterminent différents types de neurones (Jacob and Briscoe, 2003; Pierani et al., 1999). SHH participe à la ventralisation du tube neural en spécifiant le phénotype précoce de plusieurs types neuronaux le long de la ligne médiane ventrale (motoneurons de la moelle épinière, neurones dopaminergiques ou cholinergiques) et en induisant la génération des précurseurs oligodendrocytaires à partir de la moelle épinière ventrale. Par ailleurs, la voie de signalisation SHH est essentielle à la formation et la prolifération des précurseurs des cellules granulaires dans le cervelet post-natal précoce (Han et al., 2008) (Figure 7).



**Figure 7: Implication de la voie SHH dans la prolifération et la migration des précurseurs des cellules granulaires (GNPs).** SHH est sécrétée par les cellules de Purkinje et favorise la prolifération rapide des GNPs. Les GNPs se transforment en astrocytes radiaux, étape essentielle pour le développement du gyrus denté et pour le maintien de la neurogénèse chez l'adulte. EGL: external germinal cell layer; PCL: Couche des cellules de Purkinje; IGL: Couche granulaire interne; P5, P8, P21: jour après la fécondation 5, 8 et 21 respectivement (D'après (Jiang et al., 2008)).

La voie SHH a été identifiée aussi dans le cerveau adulte, où la forme active N-terminale de la molécule est exprimée dans de nombreuses régions du système nerveux mature, à un niveau plus élevé que celui rencontré au cours de la période post-natale précoce (Traiffort et al., 1999) (Traiffort et al., 2001). Bien que les rôles de SHH chez l'adulte ne soient pas complètement élucidés, il est d'abord apparu, à l'image d'autres molécules neurotrophiques, comme un facteur capable de promouvoir la survie et le maintien du phénotype des cellules souches du système nerveux (Reilly et al., 2002) (Charytoniuk et al., 2002). Dans des conditions pathologiques, telles qu'un modèle de la maladie de Parkinson ou un modèle de neuropathie périphérique, SHH est capable de préserver les projections axonales des neurones dopaminergiques dans le striatum ou de réduire le temps nécessaire à la récupération motrice consécutive à l'écrasement du nerf sciatique (Tsuboi and Shults, 2002).

Plusieurs études ont montré que la voie de signalisation SHH est aussi impliquée dans le maintien et le contrôle des tissus sains. En effet, il a été montré que la voie HH permet d'induire la différenciation des cellules souches rétinienne quiescentes en cellules progénitrices dont le cycle cellulaire et la différenciation sont plus rapides et transitoires (Agathocleous et al., 2007).

D'autres études ont pu mettre en évidence le rôle de la voie HH dans l'auto- renouvellement des cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique (Detmer et al., 2005) (Bhardwaj et al., 2001) et des cellules souches intestinales (Rizvi et al., 2005).

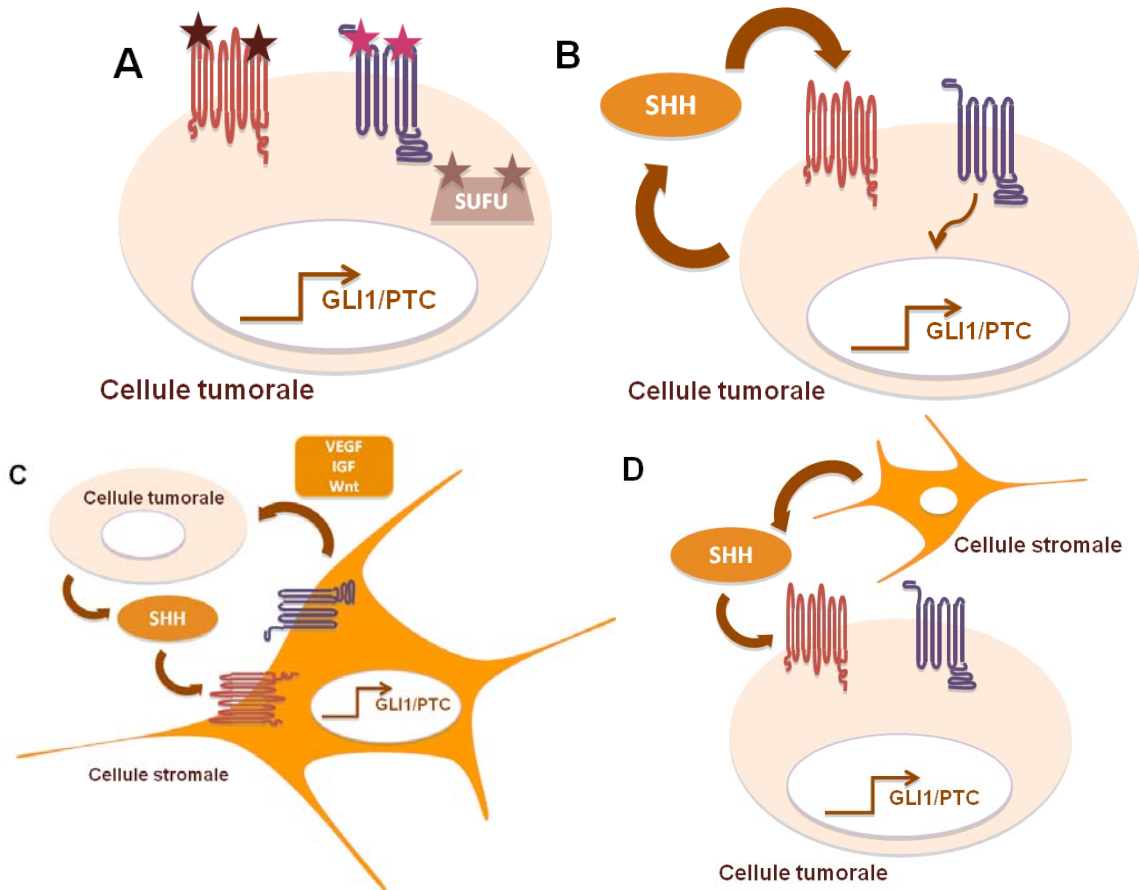
Des travaux ont montré aussi que l'activation de la voie HH chez l'embryon ou l'adulte est responsable de l'augmentation de la néo-vascularisation des tissus (Pola et al., 2001) (Byrd and Grabel, 2004). Ainsi, il a été montré que l'expression de la protéine SHH dans des cellules épithéliales entraîne la formation de structures capillaires *in vitro* et assure le renouvellement des vaisseaux *in vivo* (Pola et al., 2001) (Kanda et al., 2003). En effet, SHH induit l'apparition de phénotype d'angiogénèse y compris la prolifération des cellules endothéliales et leur migration et agit sur la régulation de plusieurs facteurs angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et l'eNOS (endothelial Nitric Oxid Synthase) (Podlasek et al., 2005). D'autres études ont confirmé cet effet, d'une part, par l'utilisation d'une thérapie génique avec le *shh* qui favorise la néo-vascularisation dans des modèles d'ischémie chez les souris (Kusano et al., 2005) (Asai et al., 2006) et d'autre part, par l'utilisation de microparticules exprimant la protéine SHH comme vecteur (Soleti et al., 2009). Toutes ces études mettent en évidence l'importance de la voie HH dans le traitement des pathologies liées au dysfonctionnement de l'angiogénèse comme dans le cas des maladies cardiaques liées à la malformation des vaisseaux coronaires (Lavine et al., 2006). De plus, cette capacité à induire la néo-vascularisation fait de la voie HH un acteur important du microenvironnement des tumeurs et participe à l'apparition de métastases.

### **C. La voie HH et les malformations congénitales :**

La voie de signalisation Hedgehog joue un rôle essentiel dans le développement de nombreux tissus embryonnaires, en particulier au niveau du système nerveux et est impliquée dans le maintien des cellules souches et la réparation tissulaire chez l'adulte. Il est donc compréhensible que la voie Hedgehog soit associée à des maladies et des malformations humaines. Des mutations congénitales conduisant à une répression constitutive du signal HH ou de sa transduction sont responsables de l'apparition de malformations sévères du cerveau et l'apparition d'un syndrome appelé : l'holoprosencéphalie. Au cours du développement, ce syndrome peut être accompagnée de malformations légères comme le bec du lièvre ou très graves, voir létales comme la cyclopie (Belloni et al., 1996).

## **D. La voie HH et les Cancers :**

La voie HH est l'une des voies de signalisation les plus impliquées dans les cancers et la plus étudiée comme cible thérapeutique. Chez l'adulte, des mutations ou une dérégulation de cette voie sont directement liées à la prolifération et la différenciation non contrôlées des cellules ou à une accélération de la croissance tumorale dans différents types de tissus. Les premières observations montrant un lien entre la voie HH et les cancers ont été faites en 1996. En effet, le carcinome basocellulaire (BCC) et le médulloblastome sont deux cancers bien étudiés montrant des mutations dans les protéines de la voie HH. Depuis, l'activation inappropriée de la voie HH a été impliquée dans le développement de plusieurs autres types de cancers, comme le cancer des poumons, de la prostate, du sein et du pancréas. De plus, des études récentes suggèrent que la voie HH pourrait aussi être impliquée dans la propagation des tumeurs aux cellules du stroma ou aux cellules souches cancéreuses (CSC) (Gupta et al., 2011). Quatre modèles ont été proposés pour expliquer l'implication de la dérégulation de la voie HH dans l'apparition des cancers (Figure 8). i) dans le cancer de type I, une mutation est à l'origine d'une suractivation de la voie HH et cette activation est indépendante du ligand comme dans les BCC et les médulloblastomes. ii) dans les cancers de type II, appelés autocrine ou juxtacrine, la suractivation de la voie HH est dépendante du ligand qui est produit et active les mêmes cellules tumorales ou les cellules voisines. iii) Dans les cancers de type III récemment décrits, il s'agit d'une activation paracrine dépendante du ligand. Dans ce type de signalisation, le HH produit par les cellules tumorales est reçu par le stroma, activant d'autres signaux dans une boucle de rétroaction vers la tumeur afin de promouvoir sa croissance ou sa survie (Scales and de Sauvage, 2009) (Rubin and de Sauvage, 2006). iv) les cancers de type IV présentent une activation paracrine inverse avec promotion de facteurs anti-apoptotiques.



**Figure 8: Implications de la voie HH dans les différents types de cancers.** (A) Cancer de type I, caractérisé par des mutations de divers membres de la voie PTC, SMO et SUFU, le rendant indépendant du ligand. (B) Cancer de type II (ligand-dépendant), le ligand est produit et agit sur la même cellule (activation autocrine) ou sur les cellules voisines (activation juxtacrine). (C) Cancer de type III (ligand-dépendant), il s'agit d'une activation paracrine où le ligand est produit par l'épithélium tumoral pour agir sur le stroma et induire des signaux nécessaires pour la croissance et la survie de la tumeur. (D) Cancer type IV, il s'agit d'une activation paracrine inverse de la voie HH. Les cellules tumorales reçoivent le signal produit par le stroma pour activer la voie HH.

## 1. Les cancers de Type I :

La première relation entre une régulation aberrante de la voie de signalisation HH et le cancer a été découverte lorsque les études ont montré que le syndrome de Gorlin est causé par une mutation inactivante dans PTC (Hahn et al., 1996). Les patients atteints de ce syndrome développent de nombreux carcinomes basocellulaires (BCC) durant leur vie et sont prédisposés au développement d'autres types de cancers comme les médulloblastomes (tumeur du cervelet) et de rhabdomyosarcomes (tumeurs des muscles striés). Une hyper activation indépendante du

ligand de la voie HH a été montrée dans la majorité des formes sporadiques du BCC, ce qui se traduit par un fort niveau d'ARN messager des gènes cibles de la voie HH comme *GLI1* et *PTC* (Dahmane et al., 1997). Les formes sporadiques de BCC, sont ainsi causées par des mutations des membres de la voie de signalisation HH (Figure 8, A). Il s'agit principalement de mutations inactivatrices de *PTC* dans 85% des cas ou activatrices de *SMO* dans 10% des cas (Xie et al., 1998). Ces observations ont été confirmées dans divers modèles de souris. En effet, les souris qui sont hétérozygotes pour une mutation de *PTC* (utilisé comme modèle murin du Syndrome de Gorlin) ont une plus grande fréquence de développement des médulloblastomes et sont sensibles à la formation de BCC induits par les UV, similaires à ceux des patients atteints du syndrome de Gorlin (So et al., 2006). D'autres études ont montré aussi qu'environ un tiers de tous les médulloblastomes et rhabdomyosarcomes est dû à des mutations de *PTC* et parfois à des mutations *SUFU* (Tostar et al., 2006). Étant donné que ces tumeurs sont indépendantes du ligand, les inhibiteurs de la voie HH développés doivent agir directement sur *SMO* ou en amont/aval de ce récepteur pour être efficaces.

## **2. Les cancers de Type II :**

Ces dernières années, une activation constitutive de la voie HH a été montrée dans plusieurs types de cancers comme les cancers de l'estomac, de la langue, du poumon, du sein, de la prostate et du pancréas. Dans la plupart de ces tumeurs, aucune mutation somatique dans la voie de signalisation HH n'a été mise en évidence. Cependant il a été démontré qu'une activation autocrine de la voie est dépendante du ligand (Figure 8, B). Dans ce type de cancer, les cellules tumorales produisent et répondent au morphogène HH (Berman et al., 2003) (Thayer et al., 2003) (Watkins et al., 2003) (Karhadkar et al., 2004) (Sicklick et al., 2006) (Clement et al., 2007). L'activation de la voie peut se produire dans toutes les cellules tumorales ou dans un petit nombre de cellules souches tumorales. Dans la plupart des cas, ces tumeurs montrent une sur expression des ligands HH (*SHH* ou *IHH*) et/ou une expression ectopique de *PTC* et *GLI* dans le compartiment épithélial. La croissance de la tumeur peut être efficacement réprimée par inhibiteurs de la voie tels que les anticorps anti HH ou les antagonistes de *SMO*.

### **3. Les cancers de Type III :**

Des études récentes ont montré que l'apparition de tumeur suite à une dérégulation de la voie de signalisation HH peut se produire par l'intermédiaire de mécanismes paracrines et souligne l'importance de cette voie dans le maintien du microenvironnement de la tumeur (Figure 8, C) (Yauch et al., 2008). En effet, il s'agit d'un type de cancer dans lequel les cellules tumorales produisent le ligand HH et les cellules stromales environnantes réagissent en produisant des facteurs de croissance supplémentaires pour maintenir la croissance ou la survie de la tumeur comme l'IGF, un facteur de croissance analogue à l'insuline ou le VEGF, facteur de croissance vasculaire endothélial. L'expression de ces facteurs est régulée de la même manière que celle de GLI et d'autres gènes cibles de la voie HH dans des modèles de tumeurs de xénogreffe traitées avec des inhibiteurs de la voie HH. Le moyen le plus efficace de traiter ces tumeurs serait éventuellement d'utiliser une combinaison d'un inhibiteur de la voie HH pour cibler le stroma et d'autres médicaments pour cibler les cellules tumorales (Yauch et al., 2008) (Theunissen and de Sauvage, 2009)

### **4. Les cancers de Type IV :**

Un modèle de signalisation paracrine inverse a été mis en évidence très récemment, dans lequel le morphogène HH est sécrété par le stroma pour activer les cellules tumorales (Figure 8, D). Cela a seulement été observé dans les hémopathies malignes comme le myélome multiple, le lymphome et la leucémie, dans lesquels le HH sécrété à partir du stroma est indispensable pour la survie des cellules B cancéreuses en induisant une augmentation de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 (Dierks et al., 2007) (Hegde et al., 2008).

### **5. Les cancers des cellules souches:**

Des études récentes ont montré l'existence d'une population de cellules souches tumorales (CSC), qui comme les cellules souches des tissus sains, sont capables de se multiplier lentement et de s'auto-renouveler et se différencier en différents de types de lignées cellulaires. Le contrôle de ces processus dans les cellules cancéreuses est régulé par les mêmes voies de signalisation

que les cellules normales telles que HH, Wnt, Notch et BMP. Il a été démontré que la prolifération non contrôlée de ces cellules souches et la formation de tumeur sont directement liées aux dérégulations de ces voies (Rubin and de Sauvage, 2006). En effet, des études ont montré que la voie de signalisation HH est impliquée dans la stimulation des CSC dans le sein et le myélome multiple ainsi que dans le maintien des cellules souche leucémiques du myéloïde chronique (Liu et al., 2006) (Clement et al., 2007) (Dierks et al., 2007) (Peacock et al., 2007). L'implication de la voie de signalisation HH dans plusieurs types de CSC fait d'elle une cible thérapeutique prometteuse pour combattre ce type de cancers, en combinant l'utilisation des inhibiteurs de la voie avec d'autres composants connus pour bloquer les tumeurs ou la radiothérapie. Ceci a été confirmé par une autre découverte récente qui montre que la voie HH régule positivement l'expression des pompes de transport de drogues dans les cellules souches, leur permettant de résister à l'absorption de médicaments cytotoxiques (Chen et al., 2007).

## **E. Les inhibiteurs de la voie HH :**

La compréhension du mécanisme d'activation de la voie HH dans certaines tumeurs est une étape essentielle dans la sélection des stratégies à adopter pour d'inhiber cette voie en optimisant l'effet thérapeutique des différents agents. En effet, dans certaines tumeurs à activation autocrine ou paracrine, la combinaison de différentes stratégies est nécessaire pour contrôler l'activation de la voie HH.

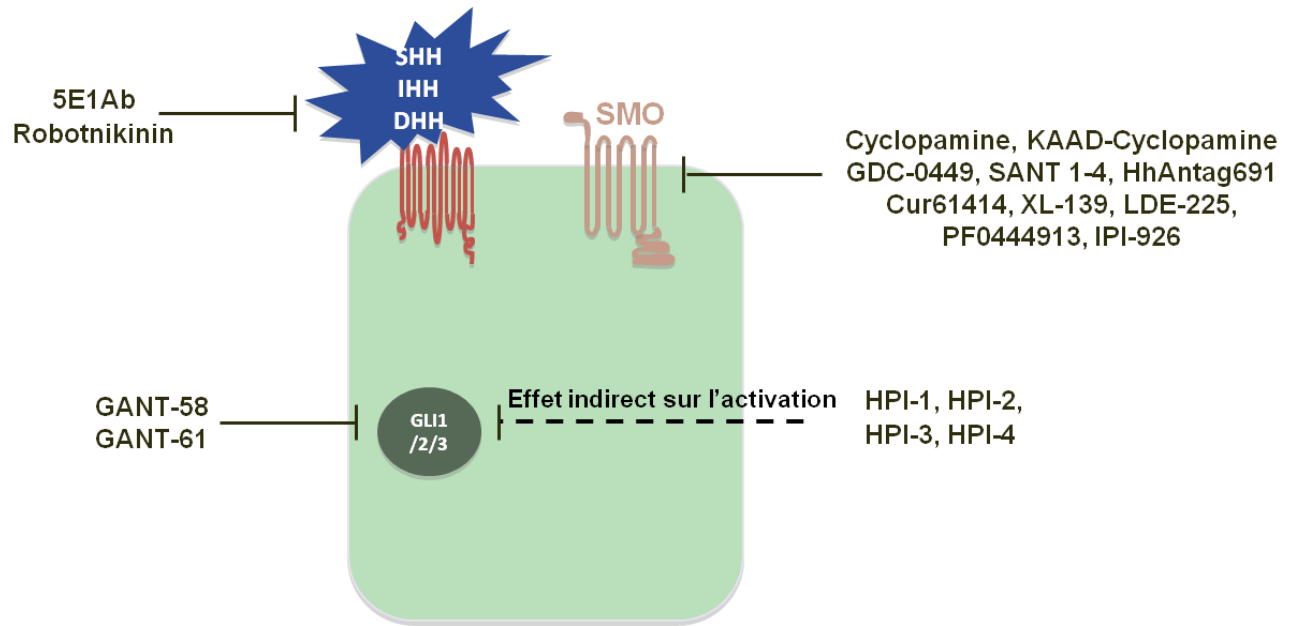
Le premier inhibiteur connu de la voie HH est la cyclopamine. Il s'agit d'un alcaloïde extrait de la plante *Veratum californicum*. Il a été découvert chez les agneaux dont la mère a mangé cette plante pendant la gestation, et qui souffrent de cyclopie (Binns et al., 1963) (Keeler, 1969). Ce composé se fixe directement sur SMO et inhibe son activité entraînant, chez l'embryon, l'apparition d'un syndrome directement lié à une inhibition de la voie HH : l'holoprosencéphalie (Chen et al., 2002). Cependant, la cyclopamine montre une faible affinité et des paramètres pharmacocinétiques et de biodisponibilité qui rendent cette molécule naturelle peu efficace en thérapeutique. Pour remédier à ce défaut, plusieurs dérivés comme le SANT1-SANT4, CUR-61414, HhAntag-691, le GDC-0449, MK4101, IPI-926 et BMS-833923 ont été testés dans des modèles précliniques et ont montré une inhibition efficace de SMO dans les



tumeurs BCC et les médulloblastomes (Robarge et al., 2009; Tremblay et al., 2009a; Tremblay et al., 2009b).

D'autres composants qui agissent en amont de SMO comme les anticorps 5E1 bloquent la voie HH et empêchent la liaison de HH à PTC, sont également disponibles et ont démontré des résultats convaincants dans les essais précliniques (Scales and de Sauvage, 2009). Plusieurs autres médicaments ciblant d'autres membres de la voie HH comme les inhibiteurs naturels mimant les protéines Hhip et SUFU ou les agents qui bloquent l'activité de GLI (Gant 61 et Gant 58) sont en cours de développement (Lauth et al., 2007; Lauth and Toftgard, 2007). Récemment, une petite molécule, la robotnikine qui lie la protéine SHH a été isolée à partir d'un criblage de petites molécules par la technique de « microarray » (Stanton et al., 2009).

Donc une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation de la voie HH dans diverses tumeurs est indispensable pour exploiter au maximum ces connaissances à des fins thérapeutiques et pour contrôler la prolifération des cellules cancéreuses. En outre, ces molécules ont un intérêt pour les biologistes puisqu'elles permettent de bloquer la voie HH à différents stades, aidant ainsi à élucider son mécanisme dans les cellules ou les modèles animaux (Figure 9).



**Figure 9: Les protéines HH comme cibles thérapeutiques.** Plusieurs laboratoires et industries ont pu mettre en évidence des molécules antagonistes visant principalement les protéines SMO, GLI et les ligands HH, dans le but d'inhiber la suractivation de la voie entraînant une prolifération cellulaire accrue et donc l'apparition de cancers (Hyman et al., 2009; Stanton et al., 2009) (Lauth et al., 2007; Robarge et al., 2009; Tremblay et al., 2009a; Tremblay et al., 2009b).

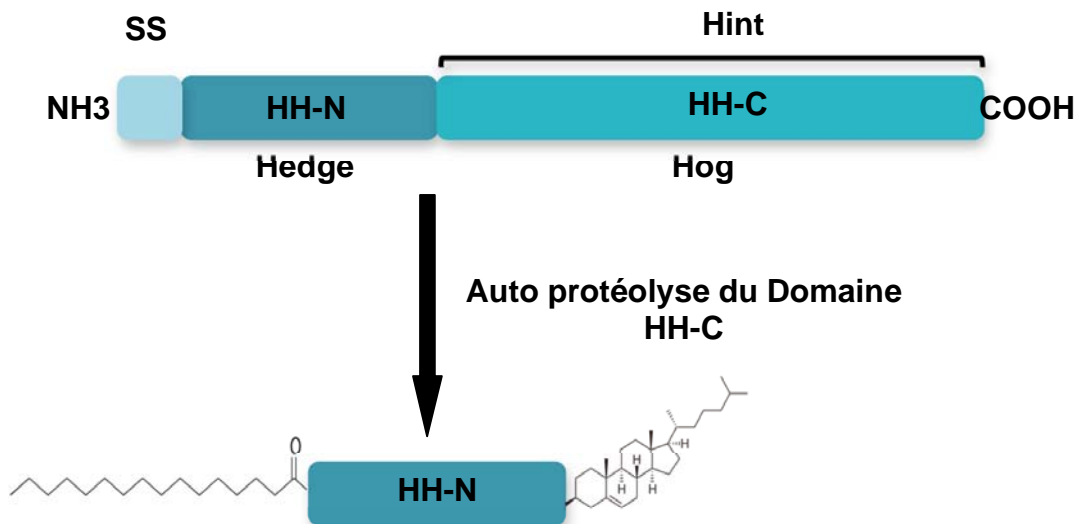
## IV. Voie HH : Mécanismes Moléculaires

### A. Synthèse du morphogène HH :

Les protéines de la famille HH sont synthétisées sous la forme d'un précurseur d'environ 45 kDa qui subit des modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi, afin d'aboutir à la forme mature et fonctionnelle de la protéine. Grâce à l'activité auto-catalytique de type intéine de son domaine carboxy-terminal, le précurseur est auto-protéolysé et cette réaction libère deux polypeptides : un peptide carboxy-terminal (HH-C) de 25 kDa et un autre amino-terminal d'environ 20 kDa (HH-N) (Lee et al., 1994) (Porter et al., 1995). L'autoprotéolyse du précurseur passe par la formation d'un intermédiaire thioester qui va subir une attaque nucléophile sur un motif très conservé (Gly-Cys-Phe) de la part d'une molécule de cholestérol, ce qui engendre la formation d'une liaison covalente entre cette molécule et la partie carboxy-terminale du peptide HH-N. L'activité auto-catalytique de ce peptide HH-C et son rôle dans le transfert de la molécule

de cholestérol, restent les deux activités biologiques rapportées pour le peptide HH-C (Porter et al., 1996).

La protéine HH-N ainsi modifiée est ensuite palmitoylée par l'acyltransférase transmembranaire Skinny Hedgehog sur la cystéine C85 qui devient amino-terminale après clivage du peptide signal (Chamoun et al., 2001) (Figure 10). Ces modifications lipidiques sont indispensables à l'augmentation de son activité biologique et pour son ancrage à la surface des cellules (Lee et al., 2001). De plus, la modification par le cholestérol de HH-N influence le champ d'action de HH en affectant sa palmitoylation, son accumulation et sa diffusion. En effet, il a été montré que des protéines tronquées qui miment le HH-N sans la liaison au cholestérol sont altérées dans leurs capacités de migration et d'activation de la voie, ce qui rend cette modification indispensable au mouvement extracellulaire du signal après sécrétion (Callejo et al., 2006) (Gallet et al., 2003) (Lewis et al., 2001).



**Figure 10: Maturation de la protéine HH.** HH est synthétisée, dans une cellule émettrice, sous forme d'un précurseur d'environ 45 kDa qui subit une autoprotéolyse via une activité enzymatique de type intéine assurée par le domaine Hint, libérant ainsi le fragment N-terminal (HH-N) responsable de l'activité biologique de la protéine. Ce fragment va subir deux modifications lipidiques : la fixation d'un groupement cholestérol au cours du clivage du C-terminal et d'un palmitate sur le résidu cystéine en N-terminal par la transférase Skinny Hedgehog. SS: peptide signale; Hint: domaine responsable de l'autoprotéolyse via une activité enzymatique de type intéine; SRR: région de reconnaissance des stérols.

Chez la drosophile, des études ont montré qu'un composant des radeaux lipidiques des membranes appelé Flotillin-2 est essentiel à la sécrétion des molécules de HH modifiées. Des mutants du gène *flotillin-2* ont un niveau très bas de HH extracellulaire contrairement aux mutants surexprimant ce gène, qui montrent une augmentation de la sécrétion de HH à partir des cellules productrices (Katanaev et al., 2008).

## **B. Sécrétion et diffusion du morphogène HH :**

La sécrétion des protéines HH modifiées par les cellules qui les produisent dépend de l'activité de la protéine Dispatched (DISP), un récepteur transmembranaire qui a été identifié initialement chez la drosophile (Burke et al., 1999). Il s'agit d'un récepteur à 12 domaines transmembranaires et avec un domaine dit « sensible aux stérols » (SSD ou Sterol Sensing Domain) (Burke and Basler, 1997) montrant ainsi une homologie de séquence avec Patched, le récepteur des protéines HH présent en surface des cellules réceptrices du signal. Des études ont montré que HH s'accumule dans les cellules des mutants dont la fonction Dispatched est altérée et que les réponses des cellules réceptrices sont perdues sauf dans les cellules immédiatement adjacentes aux cellules productrices (Kawakami et al., 2002). Deux orthologues, *Disp1* et *Disp2*, ont été isolés chez la souris, mais seul *Disp1* semble être impliqué (comme *Disp* chez la drosophile) dans la signalisation des protéines HH-N (Callejo et al., 2011).

En effet, dans le tissu épithélial du disque imaginal d'aile de la drosophile, constitué de cellules hautement polarisées, deux groupes de HH modifiés sont observés dans les pôles Apical et Basolatéral des cellules. Cependant il existe une controverse concernant le pôle cellulaire délivrant le groupe de HH actif aux cellules réceptrices. Les travaux de Callejo et al, ont montré que le morphogène HH actif est sécrété et délivré aux cellules réceptrices du compartiment antérieur en passant par un transport basolatéral dans les cellules émettrices. La protéine HH-N est d'abord dirigée vers la membrane apicale et ensuite internalisée dans des vésicules de type endosomes précoces. La protéine HH-N est alors reconnue par DISP, et le complexe HH-N/DISP est dirigé vers la membrane basolatérale des cellules émettrices où le gradient HH sera formé. Les travaux d'Ayers et al, suggèrent que le gradient de HH est principalement formé au pôle apicale des cellules. En effet, empêcher la formation de ce gradient a un effet direct sur

l'expression des gènes cibles dans les cellules loins de la source. La diffusion longue distance de HH fait intervenir la protéine Dally qui contrôle le niveau apical du morphogène et sa libération permettant ainsi la formation d'un gradient. Les expériences ont montré que le clivage de l'anchrage à la membrane de Dally par l'hydrolase Notum a un effet direct sur la propagation longue distance de HH au pôle apical (Ayers et al., 2010).

Des études dans le disque imaginal de drosophile ont montré que la fixation du cholestérol sur le HH-N est essentielle à l'incorporation de ce dernier en une forme multimérique de HH-N, associée à des lipoprotéines, dans laquelle les groupements lipidiques de chaque monomère sont masqués pour augmenter la solubilité de l'ensemble (Callejo et al., 2006) (Chen et al., 2004) (Goetz et al., 2006) (Peters et al., 2004) (Stamatakis et al., 2005). En effet, des essais sur tamis moléculaire ont montré que le fragment HH-N est élué dans des fractions de hauts poids moléculaires sous forme de structures de type micelles (tailles entre 100 et 700kDa) et ces fractions sont capables de se fixer sur les membranes de cellules en culture contrairement à la forme monomérique de HH-N (Su et al., 2007). Ainsi, cette particule aurait un fort potentiel de signalisation longue distance (50  $\mu\text{m}$  dans le disque d'aile de la drosophile et 300  $\mu\text{m}$  dans le bourgeon des membres des Vertébrés) (Panakova et al., 2005) (Eugster et al., 2007).

La régulation de la diffusion de HH-Np dépend aussi entre autres des protéoglycane à héparane sulfate (HSPG). Les glypicans forment une sous-famille de HSPG qui se lie à la surface extracellulaire de la membrane plasmique grâce à un ancrage par un Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) (Filmus and Selleck, 2001). Ils comportent un corps protéique sur lequel sont attachées des chaînes de glycosaminoglycane (GAG) (Belenkaya et al., 2004). Six glypicans ont été identifiées chez les mammifères (GPC1-GPC6) et deux chez la drosophile (Dally et Dally-Like) (Baeg et al., 2001) (Nakato et al., 1995) (Paine-Saunders et al., 1999). Plusieurs études ont montré que les glypicans contrôlent la stabilisation de HH en le protégeant de la dégradation (Bornemann et al., 2004) et qu'elles jouent un rôle dans sa diffusion et la formation de son gradient de concentration dans le milieu extracellulaire (Fujise et al., 2003). Des études récentes ont montré que ces glypicans semblent avoir des rôles opposés chez la drosophile et la souris (Beckett et al., 2008) (Capurro et al., 2008) (Gallet et al., 2008).

En fait l'image est compliquée et d'autres voies de transport ont été mises en évidence pour assurer la diffusion de cette protéine doublement lipidée dans un milieu hydrophile jusqu'à sa destination. Il semblerait que ces voies de transport dépendent des tissus et des contextes de développement (Therond, 2012).

## **C. Réception du signal HH :**

### **1. Le récepteur Patched :**

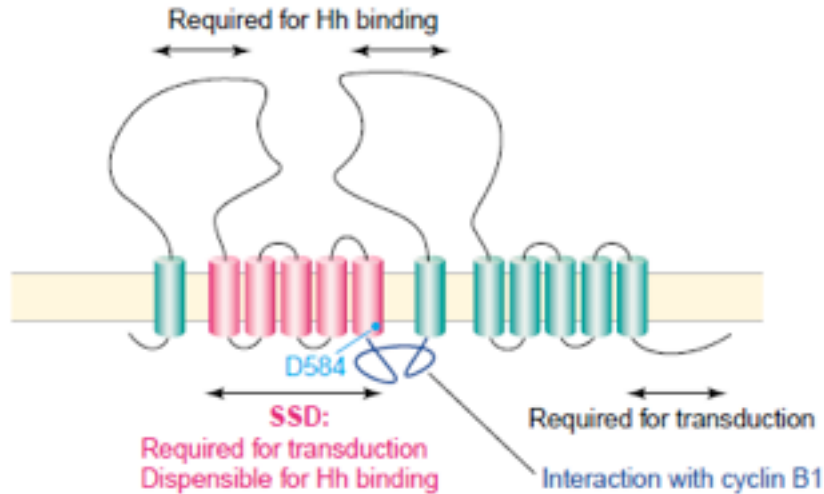
Le récepteur des protéines HH, Patched (PTC) est une des protéines-clés de la voie. PTC est un récepteur original : contrairement aux autres récepteurs qui sont connus pour activer leurs voies respectives quand les ligands sont fixés, il joue le rôle d'inhibiteur, bloquant ainsi la voie HH en absence de ligand.

Il a été initialement identifié à cause de son rôle dans la polarisation antéro-postérieure des segments chez la drosophile (Ingham et al., 1991), mais le gène *ptc* a été extrêmement bien conservé au cours de l'évolution. Un seul gène *ptc* a été découvert chez la drosophile contre deux homologues *ptc1* et *ptc2* chez les vertébrés et *C. elegans* (Goodrich et al., 1996; Johnson et al., 1996; Marigo et al., 1996).

Vu le rôle important joué par PTC, plusieurs études ont été réalisées pour caractériser ce récepteur afin de mieux comprendre les mécanismes d'activation et d'inhibition de la voie HH. PTC est une protéine d'environ 145 kDa qui comprend douze domaines transmembranaires (DTM) et deux boucles hydrophiles extracellulaires. Les extrémités amino et carboxy terminales du récepteur sont situées dans la partie intracellulaire de la cellule réceptrice. Les protéines PTC possèdent une structure particulière qui a donné naissance à une famille de protéines appelées PTR (Patched Related proteins). Dans cette famille, nous retrouvons aussi les protéines Niemann-Pick C1 (NPC1) et DISP. PTC comprend aussi un domaine SSD indispensable à la fonction inhibitrice de ce récepteur (Kuwabara and Labouesse, 2002) et caractérisé par la succession de cinq domaines transmembranaires conservés, comme DISP, correspondant aux DTM 2 à 6. Ces domaines ont été identifiés dans plusieurs protéines impliquées dans

l'homéostasie du cholestérol comme la HMGCoA réductase ou dans son transport intracellulaire comme la protéine NPC (Carstea et al., 1997) (Loftus et al., 1997).

Le domaine de PTC nécessaire à la liaison aux protéines SHH se situe au niveau des deux grandes boucles extracellulaires (Briscoe and Ericson, 2001) (Figure 11). Cette interaction est stabilisée par d'autres partenaires extracellulaires appelés co-récepteurs : les protéines transmembranaires IHOG (Interference hedgehog) et BOI chez la drosophile et leurs orthologues chez les vertébrés, les protéines CDO et BOC (Tenzen et al., 2006). Des études ont montré que la protéine IHOG interagit directement avec le morphogène HH et est capable d'activer la voie en absence de PTC dans des cellules de disque imaginal et dans des embryons de drosophile (Yao et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la protéine IHOG constitue un récepteur pour la protéine HH comme PTC.



**Figure 11: Topologie du récepteur membranaire PTC.** Il s'agit d'un récepteur à 12 domaines transmembranaires, caractérisé par la présence d'un domaine SSD (Stérol Sensing Domain) indispensable à sa fonction et par deux grandes boucles extracellulaires nécessaires pour la fixation du morphogène HH. Une mutation simple dans le résidu D584N du domaine SSD bloque la voie HH (D'après (Kuwabara and Labouesse, 2002)).

PTC permet la séquestration de HH par les cellules réceptrices et régule son effet activateur par une internalisation du complexe PTC/HH et sa dégradation ciblée au lysosome (Gallet and Therond, 2005).

PTC montre une homologie structurale avec une famille de protéines bactériennes : la famille des RND (Resistante Nodulation Division). Ces transporteurs utilisent le gradient électrochimique des protons pour faire sortir toute une variété de substrats. L'activité des transporteurs RND nécessite un motif GxxxD et l'altération de l'aspartate de ce motif réduit considérablement l'activité de transport de ces protéines (McKeegan et al., 2003). Ce motif est extrêmement conservé dans le domaine DTM4 de PTC et sa mutation dans PTC réduit considérablement son activité inhibitrice sur la voie Hedgehog (Reviewed in Kuwabara and Labouesse, 2002).

Enfin, le gène *ptc* est l'une des principales cibles transcriptionnelles de la signalisation HH, ce qui constitue une boucle de régulation pour l'activation de la voie HH.

## **2. Le récepteur Smoothened :**

Des analyses génétiques chez la drosophile et chez les vertébrés ont montré que la réponse transcriptionnelle au signal HH dépend de l'activité du récepteur à sept domaines transmembranaires Smoothened (SMO) (Alcedo et al., 1996). Le récepteur SMO ne lie pas directement les protéines HH, mais est responsable de la transmission du signal HH à l'intérieur de la cellule réceptrice. Il s'agit d'un membre divergent de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) dont il n'existe qu'un homologue chez les vertébrés. La topologie de SMO est constituée de quatre régions extracellulaires, sept hélices transmembranaires et quatre régions cytoplasmiques. Les quatre portions extracellulaires, très riches en cystéine (CRD) sont très conservées chez cette famille et des mutations dans cette région chez la drosophile et le poisson zèbre entraînent une perte de fonction de ce récepteur (Nakano et al., 2004) (Aanstad et al., 2009). Une étude récente a montré que ces cystéines s'engagent dans des ponts di-sulfures qui facilitent une conformation de SMO inactive en l'absence de HH et un état pleinement actif en réponse au ligand. Des mutations de ces cystéines très conservées dans une boucle extracellulaire de SMO montrent un effet direct sur l'activation de la voie HH, même en absence de ligand. D'une part, la mutation des cystéines dans la première boucle (C320A et C339A) entraîne une activation de la voie HH dépendante de SMO et équivalente à une activation par le ligand HH. Ce



résultat a été montré chez la drosophile et chez les mammifères. D'autre part, une mutation ponctuelle de la Cystéine (C413A) dans la deuxième boucle entraîne une diminution de l'activation de la voie HH. La délétion de cette boucle rend le récepteur SMO constitutivement actif montrant que cette boucle est indispensable à la régulation de l'activité du récepteur (Carroll et al., 2012). Le domaine central de la protéine est très conservé aussi, il est formé de 7 domaines transmembranaires. La fonction de couplage aux protéines G hétérotrimériques n'a pas été montrée comme étant importante pour la voie HH, mais des analyses fonctionnelles chez la drosophile ont montré que SMO est capable de réguler le niveau de l'AMPc via son interaction directe avec la protéine G $\alpha$ i (Ogden et al., 2008).

Contrairement aux autres régions, la partie C-Terminale intracellulaire (CTD) n'est pas très conservée. En particulier, le CTD chez la drosophile est plus long de 300 acides aminés que celui des vertébrés et cette région supplémentaire est indispensable pour l'interaction directe avec la protéine Costal2 (COS2) chez la drosophile. Il a été montré aussi que COS2 interagit avec le récepteur SMO quand la voie HH est activée ou pas (Ruel et al., 2003). L'activation de la voie entraîne la phosphorylation de SMO et son accumulation ce qui entraîne l'augmentation de l'association du complexe SMO-COS2 (Lum et al., 2003). En effet, le CTD contient un certain nombre de motif K/R-K/R-X-T/S qui sont phosphorylés par la Protéine Kinase A (PKA), neutralisant ainsi les interactions électrostatiques positives avec les résidus Arginine adjacents et entraînant un changement conformationnel, observé par FRET (Zhao et al., 2007). Les mêmes interactions électrostatiques entre les résidus arginine du CTD responsables de ce changement conformationnel ont été identifiées aussi chez le récepteur SMO des vertébrés. Cependant, les sites de phosphorylation par la PKA ne sont pas conservés chez le récepteur SMO des vertébrés et les mécanismes de ce changement restent inconnus (Zhao et al., 2007).

Une grande divergence entre drosophile et vertébrés réside aussi dans la localisation du récepteur SMO chez les vertébrés dans les cils primaires en réponse à l'activation de la voie HH. En effet, un motif de localisation au cil primaire très conservé chez les vertébrés a été identifié dans le domaine CTD dans une région très proche de la membrane (Corbit et al., 2005). Ce motif est conservé aussi chez la drosophile et chez les plantes, mais l'activation de la voie HH chez ces organismes ne fait pas intervenir les cils primaires.

Des travaux récents ont permis la purification de la protéine SMO humaine après une expression dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (NehmÈ et al., 2010). Les quantités obtenues ont permis de caractériser le récepteur en solution et de montrer que celui-ci adopte une conformation native dans les membranes de levures et que cette conformation est stabilisée par l'ajout de surfactants fluorés (C(8)F(17)TAC) ainsi que par une mutation ponctuelle dans la troisième boucle intracellulaire (G435R) lors de son extraction des membranes. L'effet sur l'activité de SMO a été confirmé par la mise en évidence de son interaction avec son antagoniste la cyclopamine, à la fois sur des extraits membranaires et sur le récepteur purifié. En effet, des mesures d'interaction entre le récepteur SMO et un analogue fluorescent de la cyclopamine (Bodipy-cyclopamine) ont permis de mesurer une constante de dissociation entre 1.7 et 5.7 nM. Cette interaction a été confirmée aussi par des mesures de résonance plasmonique de surface "Biacore".

### **3. Relation PTC /SMO :**

#### **a. Quel messenger entre PTC et SMO ?**

De nombreuses études, en particulier génétiques chez la drosophile, ont démontré l'importance des deux protéines transmembranaires PTC et SMO pour la transmission du signal HH. En effet, en absence du signal HH, PTC inhibe SMO et toute la voie est inhibée. Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel PTC inhibe SMO en l'absence de HH n'est pas encore complètement élucidé. Il existait deux principales hypothèses concernant la nature de l'interaction entre PTC et SMO. La première décrit une interaction physique entre les deux protéines, où une molécule de PTC lierait physiquement une molécule de SMO, et formerait un complexe récepteur HH. Cette hypothèse a été par la suite invalidée suite aux expériences qui ont montré qu'en culture de cellules humaines transfectées, la protéine PTC agissait probablement de manière catalytique sur la protéine SMO et inhibe cette dernière de manière non stœchiométrique. En effet, une mole de protéine PTC peut inhiber jusqu'à 50 moles de protéine SMO, ce qui va à l'encontre d'une interaction directe (Taipale et al., 2002). La deuxième hypothèse propose que

PTC fonctionnerait comme un transporteur de molécules lipidiques qui peuvent agir comme inhibiteurs ou activateur de SMO, en se basant sur la ressemblance de PTC avec les récepteurs RND bactériens (Chen et al., 2002). En effet, il a été montré que l'internalisation de la protéine PTC est capable d'internaliser des molécules lipidiques appelées lipophorines dans des endosomes et de réguler leur trafic ainsi que celui de SMO via son domaine SSD (Khaliullina et al., 2009). PTC régulerait ainsi la dégradation de SMO en agissant sur la composition lipidique des endosomes par lesquels SMO transite.

Des études récentes chez la drosophile ont montré l'implication du phospholipide PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate) dans la régulation de l'effet de PTC sur SMO. En effet, les récentes découvertes sur la régulation de la synthèse et du recyclage du PI4P et les expériences menées sur des cellules de fibroblastes, suggèrent que SMO est activé quand le niveau intracellulaire du PI4P augmente. La perte de l'activité de la protéine kinase STT4 entraîne l'apparition de phénotypes similaires à une perte de fonction HH au cours du développement chez la drosophile. Au contraire, une inhibition de la Phosphatase Sac1, nécessaire pour la déphosphorylation du PI4P en PI, entraîne l'apparition de phénotypes caractéristiques d'un gain de fonction HH (Yavari et al., 2010). En effet, la protéine Sac1 est impliquée dans la régulation de la localisation membranaire de SMO et fonctionne en aval des protéines PTC et STT4. Tous ces résultats ont permis aux auteurs de proposer un modèle dans lequel PTC inhibe directement ou indirectement l'accumulation de PI4P. Lorsque HH se fixe sur son récepteur, le niveau de PI4P va augmenter et entraîner la stabilisation de SMO à la membrane et son activation.

Une autre étude réalisée sur des cellules de fibroblastes de souris (la souche NIH 3T3) a permis de montrer que l'augmentation de la concentration intracellulaire du cholestérol dans la cellule permet de stabiliser le récepteur SMO à la membrane plasmique. En effet, lorsque SHHN interagit avec son récepteur PTC et le complexe est internalisé, la concentration intracellulaire du cholestérol augmente ce qui se traduit par une accumulation de SMO à la membrane. Des mesures de résonance plasmonique de surface "Biacore" ont permis de montrer que PTC fixe directement le cholestérol et que SHHN entre en compétition avec ce dernier pour l'interaction avec le récepteur. Ces mesures ont permis de calculer une constante d'inhibition de 0.8 à 1 nM correspondante à l'affinité de SHHN pour le PTC humain. Cette étude suggère que PTC est

capable de transporter le cholestérol et donc régule sa concentration intracellulaire. Cette régulation a un effet direct sur la stabilisation de SMO à la membrane plasmique (Bidet et al., 2011).

**b. Effet de PTC sur la durée de vie et la localisation de SMO :**

Des études sur la localisation des protéines PTC et SMO dans l'aile et les glandes salivaires de drosophile ont montré l'existence d'un lien direct entre le trafic et la stabilisation de ces protéines au niveau de la membrane. En absence de HH, PTC est localisé au niveau de la membrane plasmique, dans des endosomes précoces et de recyclage. En présence de HH, PTC est trouvée dans le lysosome avec HH où ils sont dégradés ensemble (Denef et al., 2000) (Zhu et al., 2003). Cette localisation sub-cellulaire est l'inverse de celle de la protéine SMO qui est absente de la membrane plasmique en absence de HH et s'accumule à la membrane plasmique en présence de HH. En effet, le récepteur PTC inhibe l'activité et l'accumulation de la protéine SMO au niveau de la surface cellulaire (Denef et al., 2000). De plus, l'activation exogène des cellules ou la diminution de l'activité de PTC entraîne la stabilisation de SMO et l'hyperphosphorylation de sa partie C-terminale. Cette phosphorylation entraîne soit l'inhibition de l'endocytose de la protéine SMO soit le recyclage rapide de ce dernier entre les vésicules endosomales et la surface cellulaire (Zhang et al., 2004).

**D. Le complexe intracellulaire chez la Drosophile :**

La régulation de la voie HH passe par des réseaux complexes d'interactions génétiques et moléculaires, qui sont modulés par de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications (phosphorylation, ubiquitination...) entraînent des changements d'activité biochimique, de demi-vie et/ou de localisation cellulaire des différentes protéines de la voie. Chez la drosophile, la régulation de la voie HH passe par un complexe protéique intracellulaire de composition variable et de haut poids moléculaire (1 MDa) appelé HTC : HH Transducing Complex, Formé par la kinase FU, la kinésine Costal2, le suppresseur de FU (SUFU), le facteur de transcription CI (Robbins et al., 1997; Stegman et al., 2000) et peut être MLF, une protéine

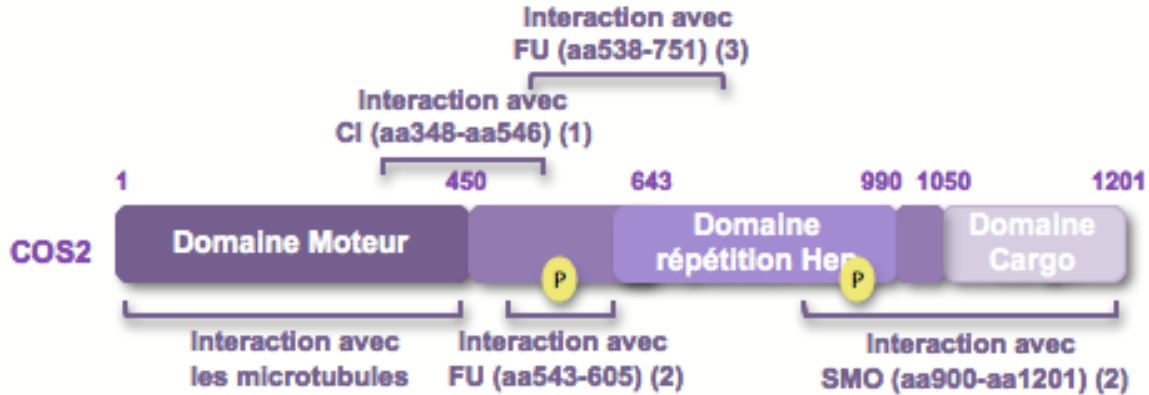
nouvellement caractérisée. Les données actuelles concernant les interactions au sein du HTC ont été obtenues par des expériences *in vitro* de type «pull-down», par la technique du double hybride chez la levure ou par co-immunoprécipitation à partir d'extraits de cellules ou d'embryons de *Drosophile*.

L'existence de véritables complexes macromoléculaires impliquant les protéines FU, COS2, CI, résistant à une colonne de tamis moléculaire et auquel est associé SUFU, a été mise en évidence par co-immunoprécipitation (Robbins et al., 1997; Sisson et al., 1997) (Stegman et al., 2000). Une dernière protéine appelée myeloid leukemia factor (MLF), très conservée dans tous les organismes et n'ayant pas de similarité avec d'autres, interagit avec SUFU et l'entraîne dans le noyau (Martin-Lannere et al., 2006).

### **1. La protéine Costal2 :**

Le gène *cos2* code pour une protéine de 1201 acides aminés avec un poids moléculaire de 133 kDa. Les domaines N et C terminaux de cette protéine sont prédits comme globulaires. COS2 est très similaire aux protéines de la famille des kinésines et son domaine N-terminal montre 25 à 30% de similarité de séquence avec les domaines moteur de ces protéines (Figure 12). Il a été montré aussi que la protéine COS2 s'accumule dans le cytoplasme des cellules répondant au signal HH et qu'elle est capable d'interagir avec les vésicules membranaires et les microtubules en fonction de l'activation de la voie HH (Sisson et al., 1997).

La protéine COS2 est connue pour son rôle de maintien du complexe intracellulaire, elle interagit avec plusieurs protéines de la voie HH : la partie cytoplasmique de SMO, CI, FU et plusieurs kinases qui régulent la voie HH (Farzan et al., 2008). La figure 12 montre les différentes régions d'interaction identifiées de la protéine COS2 avec ses partenaires.



**Figure 12: Description schématique de COS2 et de ses domaines.** COS2 appartient à la famille des Kinésines, elle contient un domaine moteur qui interagit directement avec les microtubules, un domaine à motifs répétés de résidus hydrophobes appelé motifs *heptad repeat* et un domaine Cargo qui assure l'interaction avec les protéines ou les organites à transporter. Elle interagit avec les protéines CI, FU et à la queue cytoplasmique de SMO. La protéine COS2 est probablement phosphorylée par FU sur les résidus Sérine 572 et 931 (Nybakken et al., 2002; Ruel et al., 2003) (Ruel et al., 2007). (1) : (Monnier et al., 2002) ; (2) : Ruel et al., 2003 ; (3) : (Monnier et al., 1998).

La protéine COS2 a un effet négatif sur l'activation de la voie HH et son rôle est indispensable dans la protéolyse du facteur de transcription CI en sa forme répressive de ce facteur de transcription en absence de HH. En effet, la kinésine COS2 recrute les kinases PKA, CKI et GSK3 pour hyperphosphoryler CI entier, ce qui entraîne sa reconnaissance par un complexe d'ubiquitine ligases et son adressage vers le protéasome pour son clivage et la libération de sa forme répressive CIR. En outre, l'absence de COS2 induit une accumulation ectopique de CI entier. La protéolyse de CI est restaurée par une surexpression des kinases PKA, GSK3 et CKI (Aikin et al., 2008).

Des études ont montré que la motilité de la kinésine COS2 sur les microtubules est requise pour sa fonction biologique en absence de HH et que cette motilité est importante pour sa fonction biologique. Le mouvement de la protéine COS2 nécessite la présence d'un domaine moteur actif, de l'ATP, et des microtubules. De plus, la protéine COS2 est capable de transporter d'autres composants de la voie de signalisation HH, y compris le facteur de transcription CI et le récepteur SMO. L'expression de mutants de la protéine COS2 incapables de bouger le long des microtubules montre une diminution dans leur capacité à réguler l'activité de CI et induit des phénotypes de cellules compatibles avec une perte de fonction de la protéine COS2 (Farzan et al., 2008).

Une analyse de séquence des protéines kinésines chez les vertébrés, a montré l'existence de deux orthologues de COS2 : les protéines KIF7 chez le poisson zèbre et chez la souris et KIF7 et KIF27 chez l'homme (Katoh and Katoh, 2004). Chez le poisson zèbre, KIF7 agit comme régulateur négatif des gènes cibles de la voie HH. Elle interagit directement avec la protéine GLI1 et agit comme chez la drosophile, comme protéine d'échafaudage pour le complexe HH cytoplasmique (Tay et al., 2005). Chez la souris, KIF7 joue les deux rôles de régulateur positif et négatif dans la voie de signalisation HH. D'une part, la délétion du gène *kif7*, entraîne une activation de la voie HH qui se traduit par l'apparition de polydactylie chez les souris mutantes due à une dérégulation dans la fonction répressive de GLI3. D'autre part, l'activation de la voie HH est réduite dans les souris mutantes pour le récepteur PTC et pour la protéine KIF7 et résulte en une altération de la fonction de la protéine GLI2 (Wilson et al., 2009).

Chez les mammifères, la fonction de KIF7 est dépendante des cils primaires. En effet, la protéine KIF7 en fusion avec la GFP (KIF7-GFP) est localisée au niveau de la base du cil primaire. La migration de KIF7-GFP vers l'extrémité du cil est proportionnelle à l'activation de la voie HH. KIF7 se fixe au récepteur SMO pour s'accumuler au niveau du Cil primaire et permet l'augmentation du niveau des protéines GLI2 et GLI3 (Endoh-Yamagami et al., 2009).

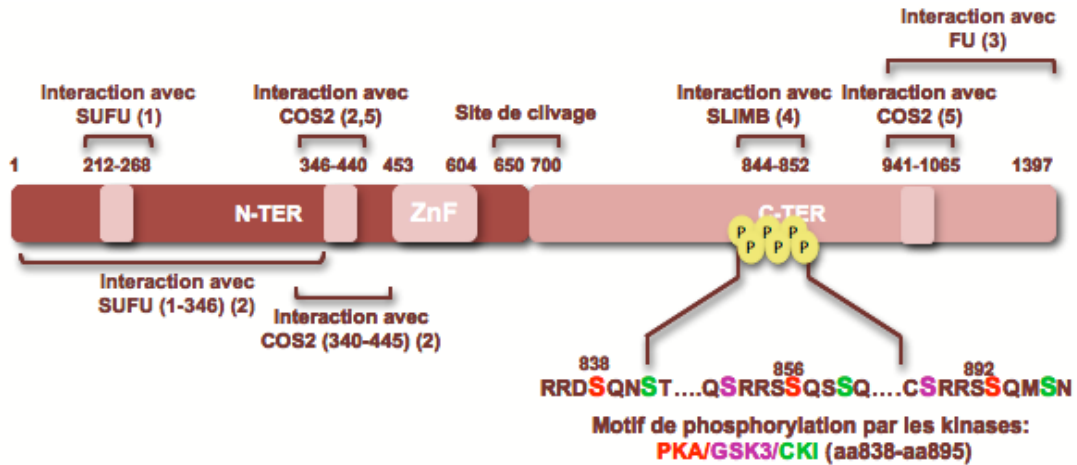
## **2. CI/GLI :**

L'implication des protéines de la famille GLI dans la transmission de l'activité transcriptionnelle de la signalisation HH a été démontrée très tôt (Forbes et al., 1993) et les gènes codant pour ces protéines sont très conservés. Le gène *gli* a été découvert pour la première fois dans les tumeurs de type Glioblastome chez l'homme où il est surexprimé (Pavletich and Pabo, 1993).

Les protéines GLI font partie de la famille des facteurs de transcription à doigts de Zinc de type C2H2 (deux cystéines et deux histidines). Chez les mammifères, la fonction de transcription est assurée par les 3 facteurs de transcription GLI1, GLI2 et GLI3. Chez la drosophile, une seule protéine GLI existe codé par le gène *Cubitus interruptus (ci)*.

La protéine CI et ses homologues GLI2 et GLI3 chez les vertébrés sont connues pour être des facteurs de transcription bi fonctionnels. En effet, leur forme entière d'environ 155 kDa constitue l'activateur transcriptionnel direct des gènes cibles de la voie HH, tels que *decapentaplegic (dpp)* et *ptc* chez la drosophile (Figure 13). Leur clivage protéolytique entraînant la perte de leurs domaines C terminaux aboutit à la libération d'une forme répressive de 75 kDa (CIR ou CI75) (Aza-Blanc and Kornberg, 1999; Aza-Blanc et al., 1997).

Les réponses transcriptionnelles aux signaux HH sont régulées essentiellement par la modification, le clivage et le trafic nucléaire des protéines GLI/CI (Ingham et al., 2011). Ainsi, chez la drosophile, la régulation de l'expression des gènes dans la cellule cible requiert l'inhibition de la forme répressive de la protéine CI (CI-75) et la translocation nucléaire de sa forme active (CI-155) (Methot and Basler, 2001). Chez les vertébrés, ces réponses sont amplifiées par un troisième facteur de transcription GLI1 qui ne possède pas le domaine N terminal répresseur et fonctionne exclusivement comme activateur de la voie HH. Le facteur de transcription GLI1 est impliqué dans les évènements tardifs de la transduction du signal HH (Bai et al., 2004).

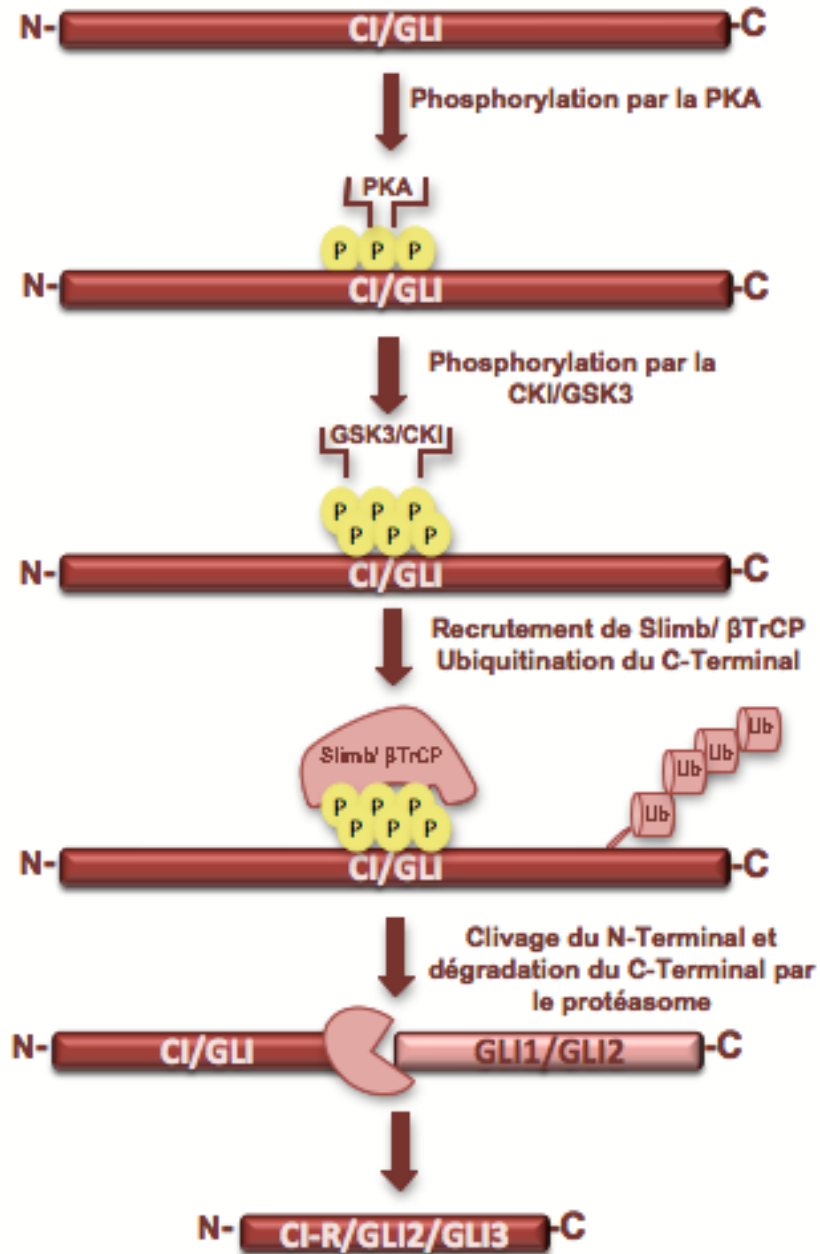


**Figure 13: Description schématique de CI et de ses domaines.** CI est le facteur de transcription de la voie HH chez la drosophile, il constitue sous sa forme complète de 155 kDa l'activateur transcriptionnel de la voie. La protéine CI fait partie de la famille des protéines à doigts de zinc (ZnF). Elle comporte des domaines putatifs d'activation et de clivage. Le site de clivage n'est pas complètement connu, il est situé dans la région entre les résidus 650 et 700. La partie C-terminale de la protéine contient un motif de phosphorylation par les kinases PKA (résidus Sérine 838, 856 et 892), CKI et GSK3 qui entraîne la reconnaissance de cette région par la protéine Slimb, son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome pour libérer la forme répressive du facteur de transcription. CI est capable d'interagir physiquement avec les protéines COS2, FU et SUFU. (1) : (Methot and Basler, 2000); (2) : (Monnier et al., 2002; Wang et al., 2000); (3) : (Wang and Jiang, 2004); (4) : (Smelkinson et al., 2007) (5) : (Wang et al., 2000).



Le clivage du facteur de transcription CI est initié par la phosphorylation par la PKA d'un motif au niveau du domaine C terminal, ce qui entraîne la phosphorylation des résidus adjacents par les sérines/thréonine kinases : la GSK3 $\beta$  et la CKI (Figure 13). La protéine Slimb chez la drosophile ou son homologue  $\beta$ -TRCP (chez les vertébrés), une protéine à boîtes F faisant partie d'un complexe E3 ubiquitine ligase, est alors recrutée pour ubiquitiner le domaine C terminal de la protéine CI et le diriger vers le protéasome où un clivage sélectif de ce domaine entraîne la libération de la forme répressive de CI (CI-75). La forme tronquée contient alors le domaine N terminal capable d'interagir avec les corépresseurs et le domaine de doigts de zinc pour la fixation sur l'ADN. Il s'agit d'un des rares cas connus de dégradation partielle par le protéasome (Figure 14).

Le clivage sélectif de la protéine CI dépend de la présence d'un domaine appelé PDD, situé entre le domaine de fixation de Slimb/ $\beta$ -TRCP et le domaine des doigts de zinc. La délétion de ce domaine entraîne la dégradation complète de CI par le protéasome (Smelkinson et al., 2007). Des études ont démontré l'importance du bon repliement domaine de doigts de zinc et de la lysine K750 (résidu d'initiation de l'ubiquitination) dans le clivage sélectif de CI. Ces deux régions forment un signal de protection unique qui empêche la dégradation complète de CI par le protéasome (Wang and Price, 2008).



**Figure 14: Clivage limité de CI/GLI par le protéasome.** Le facteur de transcription est d'abord phosphorylé par la PKA puis par les protéines GSK3 et CKI entraînant la formation d'un motif de phosphorylation spécifique reconnu par les protéines Slimb/βTrCP. La protéine CI/GLI est alors ubiquitinée et dirigée vers le protéasome pour une dégradation limitée qui permet l'élimination de la partie C-terminale et la libération de la forme répressive du facteur de transcription. Le domaine à doigt de zinc et la lysine K750 forment un signal de protection unique qui empêche la dégradation complète de la protéine CI par le protéasome (d'après (Wang et al., 2007) (Wang and Price, 2008)). Le site exacte d'ubiquitination n'est pas encore connu, la position des ubiquitine est seulement indicative.

### **3. Les protéines kinases :**

En raison de l'importance des modifications post-traductionnelles dans ce processus, plusieurs protéines kinases jouent un rôle très important dans l'activation de la voie HH. Les quatre protéines kinases fortement impliquées dans la régulation de cette voie sont : la Protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA), la caséine kinase I (CKI), la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) et la kinase Fused (FU). Les trois premières kinases ne sont pas strictement spécifiques de la voie de signalisation HH, mais elles agissent dans la régulation de nombreux processus. Ces trois kinases interagissent avec la protéine COS2 et phosphorylent des domaines conservés des protéines CI, FU et SMO. Les phosphorylation par ces kinases sont indispensables et leur suppression se traduit par l'accumulation de la protéine CI sous sa forme entière et l'activation de l'expression ectopique des gènes cibles (Price and Kalderon, 2002). D'autre part, la phosphorylation de la partie C terminale du récepteur SMO par la PKA et la CKI est indispensable à l'activation de la voie en présence de HH (Zhang et al., 2004) (Jia et al., 2004).

#### **a. LA PKA :**

Chez la drosophile, la PKA joue un rôle indispensable dans la croissance cellulaire et la différenciation. Elle phosphoryle ses substrats qui contiennent le motif consensus R-R/K-X-S/T (Taylor et al., 1990). Elle joue, d'une part, le rôle de régulateur négatif de la voie HH en phosphorylant CI sur les résidus Serines 838, 856 et 892 entraînant son clivage et la libération de sa forme répressive (Wang and Holmgren, 1999) (Chen et al., 1998; Price and Kalderon, 1999). D'autre part, elle a un rôle de régulateur positif quand la voie HH est activée. En effet, elle assure la phosphorylation de la protéine SMO sur les résidus Serines 667, 687 et 740 entraînant son accumulation à la membrane et son changement conformationnel assurant la transduction du signal HH (Apionishev et al., 2005; Zhang et al., 2004; Zhao et al., 2007).

Des études récentes ont montré que la perte complète de l'activité de la PKA chez la souris conduit à une létalité au milieu de la gestation et un tube neuronal complètement ventralisé, phénotypes analogue à la perte des protéines PTC ou SUFU, démontrant que la PKA

est aussi un fort régulateur négatif de la voie HH chez les vertébrés. Les analyses génétiques ont montré aussi que la PKA est importante pour la production de la forme répressive GLI3 et que sa fonction principale dans le développement neural est de restreindre l'activation de GLI2 (Tuson et al., 2011). Ces données suggèrent un modèle dans lequel la PKA agit à la base du cil après le transit des protéines GLI par le cil primaire. Le rôle de régulateur positif dans l'activation de la voie HH analogue à celui trouvé chez la drosophile n'a pas encore été mis en évidence. En effet, chez les vertébrés, la protéine SMO ne contient pas le motif consensus de phosphorylation par la PKA et ne semble pas être un de ses substrats.

**b. La CKI :**

La Casein kinase I (CKI) joue deux rôles dans la régulation de la voie HH. D'une part, il s'agit d'un régulateur positif par la phosphorylation de la protéine SMO *in vitro* et dans les embryons de drosophile et particulièrement les disques d'aile. Cette phosphorylation sur le motif consensus (S/T-X-X-S/T) (Flotow et al., 1990) est nécessaire pour la transduction du signal HH. D'autre part, elle joue le rôle d'un régulateur négatif en phosphorylant la protéine CI après sa phosphorylation par la PKA. En effet, des mutations sur CI suppriment la phosphorylation par la CKI, entraînant l'accumulation de sa forme longue. La phosphorylation de CI par la CKI est indispensable à la fixation de la protéine Slimb et son adressage vers le protéasome et donc a une influence directe sur l'efficacité du clivage de la protéine CI (Price and Kalderon, 2002).

**c. La GSK3 $\beta$  :**

La glycogène synthase kinase-3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) est une sérine/thréonine kinase initialement identifiée comme un régulateur clé de la synthèse insulino-dépendante du glycogène, ensuite comme acteur dans un large éventail de processus cellulaires, y compris la différenciation, la croissance, la motilité et l'apoptose. La séquence consensus de phosphorylation par la GSK3 est la suivante : S/T-X-X-X-S/T (Doble and Woodgett, 2003). Elle joue le rôle d'un régulateur négatif de la voie HH. En effet, des mutations dans les sites de phosphorylation de la GSK3 $\beta$  sur la protéine CI, empêchent sa phosphorylation et donc son clivage, d'où l'accumulation du facteur de transcription sous sa forme longue et l'activation de la voie HH (Forde and Dale, 2007). Un

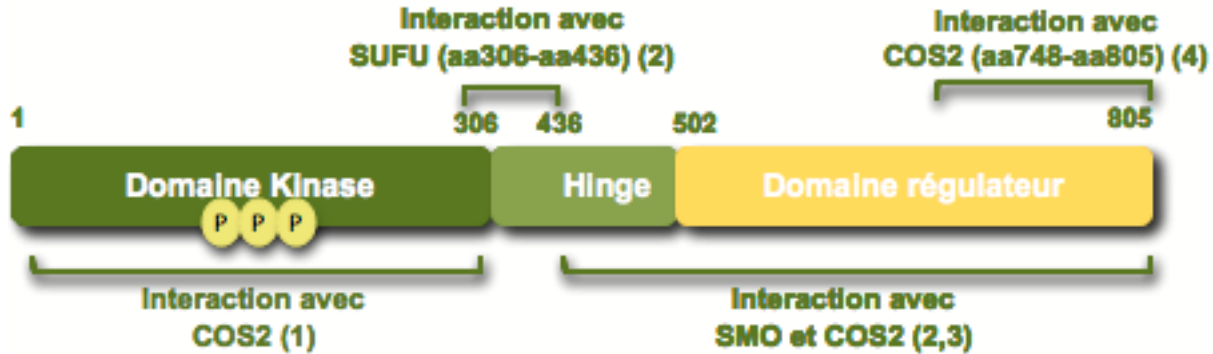
site consensus de phosphorylation par la GSK3 $\beta$  a été identifié aussi sur la partie C terminale du récepteur SMO, mais l'importance de ce site n'a pas été démontrée parce que la mutation du seul site de phosphorylation de GSK3 $\beta$  n'a pas d'effet sur l'activation de la voie (Apionishev et al., 2005).

Des études ont montré aussi que la phosphorylation de SUFU sur les résidus sérine 346 et sérine 342 par une action séquentielle de la PKA et la GSK3 $\beta$  conduit à la stabilisation de SUFU et permet de la localiser au niveau du cil primaire (Chen et al., 2011).

#### **d. FUSED :**

La protéine FUSED (FU) est une sérine/thréonine kinase qui joue le rôle de régulateur positif de la voie HH chez la drosophile. En effet, l'absence de FU réduit l'activation de la voie (Alves et al., 1998). Il s'agit d'une kinase atypique qui ne montre pas d'homologie forte avec les kinases connues et semble fonctionner de manière unique dans la voie de signalisation HH. FU est composée de deux domaines : un domaine catalytique N terminal (FU Kin) qui est très conservé et un domaine régulateur (FU Reg) qui permet l'interaction avec les protéines partenaires (Figure 15). La protéine FU interagit de manière directe avec la protéine COS2 mais aussi avec SMO et SUFU (Robbins et al., 1997). Les protéines COS2 et SUFU sont phosphorylées quand la voie HH est activée. Cette phosphorylation est complètement dépendante de l'activité de FU mais il n'existe pas d'études qui montrent que cet effet est direct (Aikin et al., 2008).

La protéine FU est phosphorylée aussi quand la voie HH est activée. Les auteurs proposent un modèle dans lequel l'activité de FU est autorégulée par un mécanisme intramoléculaire permettant l'interaction du domaine kinase et du domaine régulateur ce qui entraîne le maintien de FU sous sa forme inactive (Ascano et al., 2002). Cette interaction entre les deux domaines est très stable puisque même lorsqu'ils sont exprimés séparément, ils sont capables d'interagir (Ascano and Robbins, 2004).



**Figure 15: Description schématique de FU et de ses domaines.** FU est une sérine/thréonine kinase, elle contient un domaine d'activité kinase très conservé et un domaine régulateur qui interagit avec le domaine kinase et régule l'activité de la protéine. Elle interagit avec plusieurs protéines du complexe cytoplasmique HH dont certaines sont ses substrats. En effet, FU interagit avec les protéines COS2, SUFU et avec la queue cytoplasmique de SMO. FU est capable de s'auto activer par un mécanisme intramoléculaire d'autophosphorylation concernant plusieurs résidus et particulièrement sur le résidu Sérine 159. (1) : (Monnier et al., 1998; Monnier et al., 2002; Robbins et al., 1997) ; (2) : Monnier et al., 1998 ; (3) : (Malpel et al., 2007) ; (4) : Robbins et al., 1997.

➤ **Activation de FU :**

Plusieurs études récentes ont montré que FU est activé par SMO et COS2 via une autophosphorylation de FU et une phosphorylation dépendante de la CKI. Après son activation FU est alors capable de stimuler une réponse complète de la voie HH, en stabilisant le CI entier via la phosphorylation de COS2. En effet, l'interaction de SMO et COS2 stimule l'auto-activation de FU qui s'accumule à la membrane. Les résultats ont montré, D'une part, que SMO est indispensable au recrutement de FU à la membrane. D'autre part, FU exprimé avec un groupement palmitate (GAP-FU) la rendant membranaire était active constitutivement, est capable d'activer la voie HH (Claret et al., 2007). Il a été montré aussi que FU dimérise suite à

son activation et cette dimérisation est indispensable à l'activité kinase de la protéine. Enfin, les résultats montrent aussi que la phosphorylation de FU est indispensable à l'activation de la voie (Zhou and Kalderon, 2011). En effet, FU possède plusieurs sites de phosphorylation responsables de son activation : les résidus T154 et S158 qui sont les sites de phosphorylation par la CKI et les résidus T151, S159 et S482 qui sont décrits comme les sites d'autophosphorylation de FU (Zhou and Kalderon, 2011). D'autres travaux ont confirmé que la dimérisation de FU est suffisante pour l'activation de la voie HH (Shi et al., 2011; Zhang et al., 2011).

➤ ***Activation de COS2 par FU :***

La protéine COS2 est connue pour être le substrat de FU. Cependant, le mécanisme de phosphorylation de COS2 par FU n'est pas complètement élucidé et aucune donnée ne montre que FU phosphoryle directement COS2. Des travaux ont montré que la coexpression de FU et de COS2 dans les cellules d'insectes entraîne la phosphorylation de la kinésine qui se traduit par un changement de la mobilité électrophorétique sur gel ou un « shift ». Deux sites de phosphorylation de COS2 ont été identifiés : la sérine 572 qui constitue le site préférentiel et la sérine 931 qui est phosphorylée dans une moindre mesure (Nybakken et al., 2002). D'autres travaux ont montré aussi que la phosphorylation de COS2 sur la sérine 572 fait intervenir FU. En effet, le traitement des cellules par l'ARN interférence de FU entraîne la disparition du « shift » de COS2 sur gel et l'absence de reconnaissance par un anticorps qui reconnaît spécifiquement la sérine 572 phosphorylée (phos-SER572). L'expression de FU dans ces mêmes cellules restaure la phosphorylation de COS2 et permet la détection d'une bande spécifique par l'anticorps anti-phos-SER572 (Ruel et al., 2007). Cependant ces résultats ne mettent pas en évidence que la sérine 572 est un substrat direct de l'activité enzymatique de la kinase FU.

➤ **Rôles de FU dans la signalisation HH chez les vertébrés**

Des études ont montré que chez les vertébrés, la protéine FU n'a pas de rôle indispensable sur l'activation de la voie HH. En effet, chez la souris, l'absence de FU n'a pas d'effet sur la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse. Cependant, il a été démontré que la mort des souris dépourvues de la protéine FU après la naissance n'est pas due à une dérégulation de la voie HH mais à une dérégulation des microtubules au niveau des cils motiles (Wilson et al., 2009). Chez le poisson zèbre, des études récentes ont montré un rôle plus important de FU. En effet, les mutants FU montrent des phénotypes sévères d'une dérégulation de la voie HH durant l'embryogenèse comme la cyclopie et une asymétrie droite-gauche. D'autres travaux confirment aussi une action directe de FU sur la ciliogénèse chez le poisson zèbre. Il a été montré aussi que FU est impliquée dans la morphogenèse de l'ovaire de drosophile pendant la formation de la nymphe et dans la régulation de la différenciation des cellules germinales (Besse et al., 2005). Les études récentes ont permis de montrer que FU interagit directement avec la E3 Ligase Smurf dans un complexe qui permet l'ubiquitination et la protéolyse du récepteur de la Bone Morphogenetic Protein permettant la formation d'un gradient de cette protéine et l'activation de la différenciation des cellules germinales en cystoblastes (Xia et al., 2010). Ces résultats montrent l'effet de FU dans l'activation de cette différenciation et confirment les résultats obtenus montrant que la perte de FU entraîne la prolifération non contrôlée des cellules germinales et l'apparition de tumeur (Narbonne-Reveau et al., 2006).

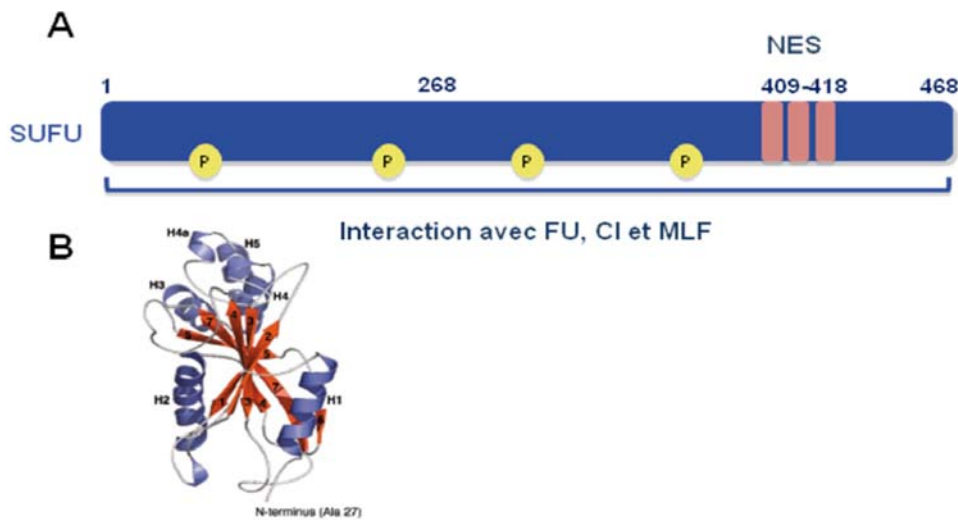
#### 4. SUFU :

Suppresseur de FU (SUFU) est un inhibiteur intracellulaire de la voie de signalisation HH dont le rôle est apparemment marginal chez la drosophile et absolument indispensable à la régulation de cette voie chez les mammifères. Le gène *sufu* code pour une protéine de 53 kDa, qui contient une séquence d'export du noyau (NES) non conservé et qui ne montre aucune homologie significative avec des protéines connues (Figure 16). Ce gène a été identifié comme un suppresseur de *fu* chez la drosophile, d'où son nom, au cours d'un crible de gènes dont la mutation compense la perte de fonction de *fu*. En effet, la létalité embryonnaire et les défauts de



l'aile causés par des mutations de FU sont tous compensés par l'expression de SUFU (Pham et al., 1995; Preat, 1992).

SUFU est phosphorylée au cours du développement embryonnaire quand la voie HH est active. Cette phosphorylation est perdue dans les mutants *fu*, suggérant que la kinase FU est directement ou indirectement impliquée dans la phosphorylation de SUFU (Dussillol-Godar et al., 2006).



**Figure 16: Description schématique de SUFU de Drosophile et de ses domaines.** (A) Il s'agit d'une protéine de 53 kDa, qui contient une séquence d'adressage vers le noyau (NES). SUFU interagit avec les protéines CI, FU (Monnier et al., 1998) et MLF mais les régions d'interaction ne sont pas encore connues. La protéine SUFU est directement phosphorylée par la PKA sur les résidus Sérine 128, 243, 301 et 346. (B) Un fragment du domaine N-Terminal de SUFU humain (aa27-aa268) a été cristallisé (Merchant et al., 2004). Cette région partage une identité de séquence de 47% avec le SUFU de drosophile. NES = nuclear EXPORT signal.

### a. Interactions :

Chez la drosophile, il a été montré que SUFU existe dans deux complexes protéiques distincts dans les extraits embryonnaires et dans les cellules du disque imaginal de l'aile : le complexe intracellulaire HTC se trouvant sur les microtubules et donc en interaction avec FU et CI. Le deuxième est un complexe cytosolique où SUFU interagit directement avec CI (Stegman et al., 2000). La fonction majeure de SUFU chez la drosophile est de stabiliser CI et de le séquestrer dans le cytoplasme. La phosphorylation de SUFU par FU entraîne probablement la

libération de la protéine CI sous sa forme entière en réponse à l'activation de la voie HH. Le rôle de régulateur négatif, joué par SUFU, dans la voie HH est d'empêcher l'accumulation nucléaire de CI entier et donc de limiter l'activation de la voie (Sisson et al., 1997). La protéine SUFU s'accumule dans le noyau des cellules de glande salivaire de drosophile, probablement en complexe avec la protéine CI sous sa forme entière (Sisson et al., 2006).

SUFU interagit directement avec les protéines FU et CI et les régions de FU impliquées dans l'interaction ont été identifiées par les techniques de double hybride et des Co-immunoprécipitation. En effet, SUFU interagit avec la région 306-436 de FU juste après le domaine kinase et avec la région 212-268 de CI, sur la région N-terminale juste avant le domaine des doigts de Zn (Monnier et al., 1998) (Figure 16).

Bien que SUFU ne soit pas une protéine essentielle chez la drosophile, elle est absolument nécessaire pour le développement embryonnaire chez la souris. En effet, l'élimination de SUFU chez la souris conduit à une activation indépendante du ligand de la voie HH. De plus, les embryons de souris SUFU-homozygotes meurent à la mi-gestation et présentent une ventralisation de la moelle épinière (Cooper et al., 2005) (Svard et al., 2006) (Varjosalo et al., 2006). Des mutations de SUFU sont liées à l'apparition de médulloblastome chez l'homme et au niveau des cerveaux des souris, suggérant que *sufu* est un gène suppresseur de tumeur (Lee et al., 2007). SUFU se lie directement aux protéines GLI : GLI1, 2 et 3 et régule leur activité par deux mécanismes distincts : en les séquestrant dans le cytoplasme et/ou inhibant leur activité transcriptionnelle dans le noyau. Il a été montré, dans des cultures cellulaires, que SUFU empêche la translocation dans le noyau des protéines GLI (Ding et al., 1999). Comme son homologue chez la drosophile, la protéine SUFU humaine ne montre pas de séquences caractéristiques à part une région consensus de phosphorylation par la PKA en position 128, 243, 301, 305, 342 et 346, respectivement (Merchant et al., 2004). Ainsi, la protéine SUFU recombinante produite dans des bactéries peut être phosphorylée *in vitro* par la PKA sur le site Ser346 (Chen et al., 2011).

Des études plus récentes ont montré que la protéine SUFU de souris n'est pas indispensable à la rétention cytoplasmique de GLI1 surexprimée avec la GFP mais régule le trafic

de GLI2 et GLI3 entre le cytoplasme et le noyau. Cette régulation est indépendante de la présence des cils primaires (Chen et al., 2009).

**b. Structure cristalline :**

Un fragment de la protéine SUFU humaine correspondant aux acides aminés 27-268 a été cristallisé (Figure 16 B). Cette région partage une identité de séquence de 47% avec la protéine SUFU de drosophile, dont plus de 22% est concentré dans la partie C-terminale de ce domaine. L'analyse de la structure de SUFU a révélé la présence d'une région concave très acide qui correspond à la région requise pour stabiliser GLI1 et donc la répression de la transcription.

Cette région peut jouer le rôle d'une interface fonctionnelle impliquée dans la fonction de SUFU (Merchant et al., 2004). La mutation du seul résidu acide conservé dans cette région (Asp159) perturbe l'activité de SUFU en diminuant l'affinité pour la protéine GLI1. En effet, l'analyse de ce domaine cristallisé a révélé qu'il s'agit d'une région requise pour la stabilisation de GLI1 et sa rétention cytoplasmique. Cette région très acide devient alors une surface potentiellement impliquée dans le maintien de l'activité de SUFU et son interaction avec ses partenaires (Merchant et al., 2004).

**c. Régulation de SUFU :**

Des études récentes ont montré que l'activation de la voie HH déstabilise la protéine SUFU qui est ubiquitinilée et dégradée par le protéasome en réponse à HH. Un site de fixation d'ubiquitine sur le résidu Lysine 257 (K257) de SUFU a été identifié par une analyse en chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem et les résultats ont montré que le mutant SUFU K257R est plus stable et agit de façon plus puissante comme répresseur de la transcription et comme inhibiteur de la prolifération cellulaire. Il est donc probable que la voie de signalisation HH régule l'activité de SUFU en contrôlant sa dégradation par le protéasome (Yue et al., 2009).

## 5. MLF :

Les protéines MLF (Myeloid Leukemia Factor) constituent un groupe de protéines nouvellement identifiées chez l'homme et chez la drosophile. Le gène *hMLF1* a été initialement identifié dans la translocation t (3;5) (q25.1; q34) associée aux syndromes myélodysplasiques (MDS) caractérisée par la prolifération des cellules hématopoïétiques et un défaut de l'apoptose, et dans certains cas, avec les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) (Yoneda-Kato et al., 1996). L'homme, possède deux gènes *hMLF1* et *hMLF 2*. Chez la drosophile, un unique gène a été identifié : *dmlf* mais huit isoformes existent suite à des épissages alternatifs : *dmlfA-H*.

Le variant *dmlfA* code pour une protéine de 309 acides aminés montrant 23 % d'identité de séquence avec *hMLF1* (Fouix et al., 2003; Ohno et al., 2000). La région centrale de la protéine contient 54 % de cette identité. Les protéines MLF ne montrent pas d'homologie significative avec des protéines qui ont déjà été caractérisées et leur activité biochimique est encore inconnue. La protéine *hMLF1* ne contient pas de domaines ou de motifs consensus à part un motif RSXSXP correspondant à une séquence de fixation des protéines 14-3-3 $\xi$  impliquées dans la régulation de la division, la différenciation et la mort cellulaire (Sugano et al., 2008).

### a. Localisation cellulaire :

Chez les mammifères, la protéine *MLF1* est localisée essentiellement dans le cytoplasme, mais chez la drosophile, l'une des isoformes de *dMLF* (*dMLFA*) est localisée principalement dans le noyau alors que l'isoforme *dMLFB*, qui est produite par un épissage alternatif, peut être à la fois nucléaire et cytoplasmique. Des études ont montré que les 40 derniers acides aminés de la partie C-terminale de *dMLFA* sont nécessaires et suffisants pour la localisation nucléaire de la protéine. Deux séquences d'adressage vers le noyau (NLS) ont été identifiées dans cette région et sont prédites comme responsables de la localisation nucléaire de la protéine (Sugano and Yamaguchi, 2007).

**b. Fonctions :**

Les premières études ont montré que la protéine dMLF est capable d'interagir à la fois moléculairement et génétiquement avec le facteur de transcription DREF (DNA replication-related element factor) qui est connu pour participer à la régulation positive de la transcription de nombreux gènes, en particulier ceux impliqués dans la réplication de l'ADN et la prolifération cellulaire tels que le gène codant pour la PCNA. Cette interaction a été mise en évidence par la technique de double hybride et par des coprécipitations avec la protéine MLF produite en fusion avec la Glutathion-S-Transférase (GST). La surexpression de dMLF supprime partiellement les effets induits par la surexpression du DREF dans l'œil de drosophile (Ohno et al., 2000). La caractérisation de la protéine dMLF a permis de montrer qu'elle est largement exprimée durant le développement chez la drosophile et que des mutants n'exprimant pas la protéine ne sont pas viables. Les résultats ont montré aussi que la protéine dMLF a une localisation nucléaire mais peut se trouver aussi dans le cytoplasme à certains stades du stade de développement (Martin-Lannere et al., 2006).

Un criblage génétique chez la drosophile pour identifier des gènes dont la surexpression supprime la toxicité des protéines contenant des séquences poly Glutamine (polyQ) a permis indépendamment l'identification du gène *dmlf*. En effet, l'augmentation des protéines à polyQ est impliquée dans l'apparition de maladies neurodégénératives chez l'homme comme la maladie de Huntington. Les études ont montré que la surexpression de dMLF ou de hMLF1 permet d'éliminer efficacement la toxicité induite par les protéines à poly Q dans les cellules neuronales de la rétine des drosophiles transgéniques. Ainsi, la surexpression endogène ou ectopique de dMLF dans la rétine montre que cette protéine colocalise avec les agrégats de protéines polyQ et qu'elle est capable de réduire le recrutement des protéines telles que : la protéine CBP (CREB binding protein) et la protéine HSP70. Toutes ces études suggèrent que dMLF seule ou par l'intermédiaire d'un partenaire moléculaire, peut supprimer la toxicité en séquestrant les protéines à poly (Q) et les agrégats. Cette suppression a été efficace pour différents types, longueurs et tailles de poly (Q) et dans différents types de cellules dans lesquelles elles sont exprimées (Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2002). Cette propriété est probablement due à la richesse de la protéine MLF en résidus acides.

Une étude a montré que dMLF est capable d'interagir directement avec la protéine dCSN3, une sous-unité du complexe du signalosome COP9 et qu'elle joue un rôle négatif dans l'assemblage de ce complexe (Sugano et al., 2008).

### **c. Interaction avec SUFU**

D'autres études réalisées par la technique de double hybride pour identifier de nouveaux partenaires de la protéine SUFU ont permis l'identification d'une interaction entre cette protéine et MLF. Cette étude a montré, d'une part que dMLF a une localisation nucléaire et qu'elle est associée aux chromosomes et d'autre part qu'elle est capable d'interagir directement, *in vitro* et *in vivo*, avec SUFU. En effet, la surexpression de dMLF a un effet direct sur le développement normal des cellules, entraîne une mort cellulaire programmée et l'augmentation de la synthèse d'ADN. Ces phénotypes sont accentués par une perte de fonction de la protéine SUFU entraînant l'apparition de défauts morphologiques remarquables dans l'œil de drosophile. Ces résultats suggèrent un rôle complémentaire des protéines dMLF et SUFU, au niveau de la transcription, dans la régulation de la différenciation et la prolifération cellulaires au cours du développement.

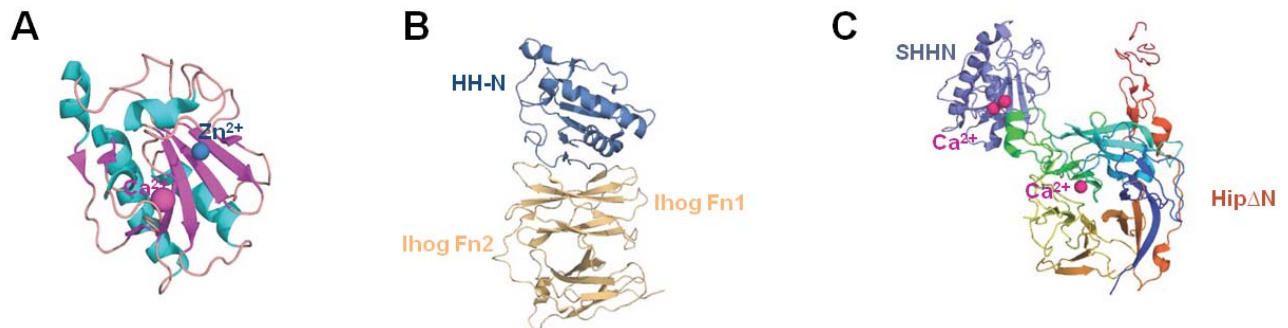
La même étude a montré que dMLF est capable d'interagir aussi avec la protéine COS2 et donc avec le complexe intracellulaire de régulation de la voie HH (HTC). Cependant l'implication directe de cette protéine dans la régulation de la voie HH n'a pas été montrée (Fouix et al., 2003).

## **V. La Voie HH : Caractérisation Structurale :**

De nombreuses études génétiques, cellulaires et fonctionnelles ont été réalisées sur les protéines de la voie HH. Cependant, il existe peu d'informations structurales ou biochimiques sur les différentes protéines. En effet, étant donné le nombre et la complexité des membres de la voie HH et de leurs interactions au niveau de la surface cellulaire comme à l'intérieur de la cellule, il a été difficile de développer une vision moléculaire de la nature et des conséquences des interactions entre les protéines et leurs partenaires. La difficulté majeure est en partie liée à des

problèmes d'isolation de protéines entières, fonctionnelles seules ou en complexe pour des analyses *in vitro*.

Récemment des études structurales, biophysiques et biochimiques de protéines seules comme la structure de SHHN de souris (Kavran et al., 2010) ou en complexe comme la structure de HH avec des fragments de Ihog (McLellan et al., 2006) ou la structure du complexe HHIP-SHHN (Bishop et al., 2009) (Bosanac et al., 2009) ( Figure 17) commencent à surmonter ces obstacles et à donner des détails moléculaires sur les mécanismes de signalisation de la voie HH. La plupart des structures cristallines obtenues concernent les protéines HH extracellulaire ou à la surface de cellules.



**Figure 17: Caractérisation Structurale des protéines HH seules ou en complexe.** Quelques structures cristallines obtenues pour les protéines HH extracellulaires seules ou en complexe avec des corécepteurs de la voie. (A) structure de SHHN (Code pdb: 3N1R) de souris (Kavran et al., 2010). (B) Structure de HH avec les fragments Fn1-2 de IHOG (Code pdb: 2IBG) (McLellan et al., 2006). (C) Structure du complexe Hhip $\Delta$ N-SHHN en présence de Calcium (Code pdb: 2WFX) (Bishop et al., 2009).

Il existe très peu de structures de protéines du complexe HTC. A ce jour, il n'existe que la structure du domaine N terminal de la protéine SUFU humaine (Merchant et al., 2004), la structure du domaine de doigts de zinc de la protéine GLI1 humaine (155 aa) en complexe avec un fragment d'ADN de 21 base (Pavletich and Pabo, 1993) et très récemment, la structure du domaine moteur de la kinésine KIF7 (Klejnot and Kozielski, 2012). Le tableau suivant résume quelques structures disponibles sur la PDB (Protein Data Bank).

Structure	Code PDB	Référence
Domaine Zn fingers GLI1 en complexe avec l'ADN	2GLI	Pavletich et Pabo, 1993
HH-C de drosophile	1AT0	Hall et al. 1997
SUFU Humain Domaine N-Ter	1M1L	Merchant et al., 2004
Complexe HhN:IhogFn12	2IBG	McLellan et al. 2006
Complexe SHHN/Hhip $\Delta$ N humains	3HO5	Bosanac et al. 2009
Complexe ShhN/Hhip $\Delta$ N de souris avec Ca <sup>2+</sup>	2WFX	Bishop et al. 2009
Complexe ShhN/5E1 Fab	3MXW	Maun et al. 2010
IHHN	3N1O	Kavran et al. 2010
SHHN de souris	3N1R	Kavran et al. 2010
Dally-Like de drosophile (région centrale)	3ODN	Kim et al., 2011

**Tableau 2 :** Liste de quelques structures de protéines impliquées dans la voie HH seules ou en complexe disponibles dans la PDB (Protein Data Bank).

Toutes ces structures ont permis de mieux comprendre les fonctions et les interactions de plusieurs protéines de la voie HH. Par exemple, la structure cristalline de SHHN déterminée il y a 15 ans a révélé une homologie inattendue avec les hydrolases à zinc avec un site de fixation de cet ion très conservé dans toutes les protéines HH sauf celle de drosophile où trois des quatre résidus clés de ce sites ne sont pas conservés (Hall et al., 1995). Cette étude a montré que le zinc joue un rôle structural et fonctionnel très important, dans la stabilité et l'activité des protéines HH (Day et al., 1999). L'analyse des structures des différents domaines de la protéine HH de drosophile a révélé que contrairement à HH-N, qui montre une homologie structurale et non fonctionnelle avec les zinc hydrolases, HH-C montre des analogies structurales et fonctionnelles avec les régions de protéine dotées d'une activité d'auto protéolyse ou les intéines. L'obtention de la structure du complexe Hhip-SHHN a permis de mieux comprendre les mécanismes d'interaction de ces protéines et d'expliquer le rôle régulateur négatif joué par la protéine Hhip. En effet, l'interaction entre les deux protéines, qui est dépendante de la présence du calcium, est assurée par une boucle de la protéine Hhip (résidus 376-338) qui s'étend jusqu'à la poche de fixation de zinc dans la protéine SHHN. Une région similaire à cette boucle a été identifiée dans la deuxième boucle extracellulaire de PTC. Un peptide qui couvre cette région de PTC est capable de fixer SHHN et de rentrer en compétition avec le peptide de la même région de Hhip pour fixer SHHN. Ce résultat montre que cette région est directement impliquée dans la fixation des protéines HH par PTC et que Hhip est capable, en compétition avec PTC, de les fixer pour la régulation de l'activation de la voie (Bosanac et al., 2009). La structure récente du complexe de



SHHN avec la région Fab de l'anticorps 5E1 a révélé que cette région lie SHHN au niveau de la zone de fixation du zinc, sur une surface qui recouvre le site d'interaction avec Hhip. Cette structure confirme l'importance de cette région pour la fonction des protéines HH et suggère que, comme pour la protéine Hhip, l'anticorps est capable d'entrer en compétition avec PTC pour la fixation de SHHN et donc d'inhiber l'activation de la voie HH (Maun et al., 2010).

## **VI. Projet de thèse :**

La régulation de la voie Hedgehog est assurée par des complexes de protéines dont les interactions entre les différents membres sont assurées par de nombreuses modifications post-traductionnelles comme les phosphorylations. Le complexe assurant la régulation de cette voie chez la Drosophile est appelé HTC : HH Transducing Complex. Les données actuelles concernant les interactions au sein du HTC ont été obtenues par des expériences *in vitro* de type «pull-down», par la technique du double hybride chez la levure ou par co-immunoprécipitation à partir d'extraits de cellules ou d'embryons de Drosophile.

La plupart des structures cristallines concernant la voie HH ont porté sur les protéines Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog et leurs partenaires extra cellulaires, tandis que les protéines intracellulaires de la voie HH ont fait l'objet de peu d'études structurales. Celles-ci concernent le domaine N terminal de SUFU, la région à doigt de zinc de la protéine GLI1 et récemment la structure du domaine moteur de la kinésine KIF7. Il est donc nécessaire d'aborder l'aspect structural et biochimique de la régulation de CI en étudiant les protéines impliquées dans le HTC.

Mon projet de thèse porte sur la caractérisation par des méthodes structurales (le Dichroïsme circulaire, SAXS, SEC MALS...) et biochimiques (tests enzymatiques) des membres du complexe intracellulaire HTC chez la drosophile et de leurs interactions, afin d'obtenir plus d'informations sur les mécanismes moléculaires qui régulent l'activation et la répression de la voie HH.

Pour réaliser des études de biologie structurale, il est nécessaire de disposer de plusieurs milligrammes de protéines pures et homogènes. Au début de ma thèse, le laboratoire ne disposait d'aucune protéine de la voie HH et j'ai dû mettre en place les conditions d'expression de

plusieurs protéines. Différentes constructions ont été clonées dans des vecteurs d'expression bactériens ou dans des cellules d'insectes avec des étiquettes d'affinité puis testées pour leur rendement d'expression et de solubilité.

Mes efforts ont porté leurs fruits puisque la protéine SUFU, un domaine de la kinase FU, la forme répressive du facteur de transcription CI (CIR), le domaine moteur de la protéine COS2 et la protéine MLF s'expriment bien en bactéries. De plus, les conditions de purification que j'ai mises au point m'ont permis d'obtenir des quantités suffisantes de protéine pour des études biochimiques, enzymatiques et structurales. Les différentes protéines ont été caractérisées en solution et plusieurs informations structurales ont été obtenues.

Les résultats obtenus sont divisés en deux grandes parties. Dans la première partie, mes travaux de thèse ont permis, d'une part, de caractériser structurellement SUFU et les informations obtenues montrent qu'il s'agit d'une protéine avec une forme allongée en solution présentant deux domaines juxtaposés prêts à interagir avec leurs partenaires. Ce travail donne lieu à un article sur le point d'être soumis. D'autre part, j'ai pu montrer que SUFU recombinant peut être phosphorylé différemment avec des extraits de cellules d'insecte selon que la voie HH est activée ou non et des essais préliminaires ont montré que SUFU est phosphorylée par FU et par la PKA.

La deuxième partie de ma thèse apporte des résultats importants concernant la caractérisation d'autres protéines du complexe HTC. Je me suis intéressée à la mesure de l'activité enzymatique de FUSED *in vitro* afin de mettre en évidence l'autophosphorylation en comparaison avec l'activité des mutants de FU que j'ai pu exprimer dans les mêmes conditions. J'ai aussi pu coexprimer et copurifier les protéines SUFU et dMLF, et des mesures en calorimétrie indiquent qu'elles forment un complexe avec une affinité de l'ordre du micromolaire. De plus, j'ai commencé l'analyse d'un domaine de COS2 et de CI-R. Ces résultats ouvrent la voie à des études structurales et cristallines de ces protéines.

# ***MATERIELS ET METHODES***

## ***Matériels et Méthodes***

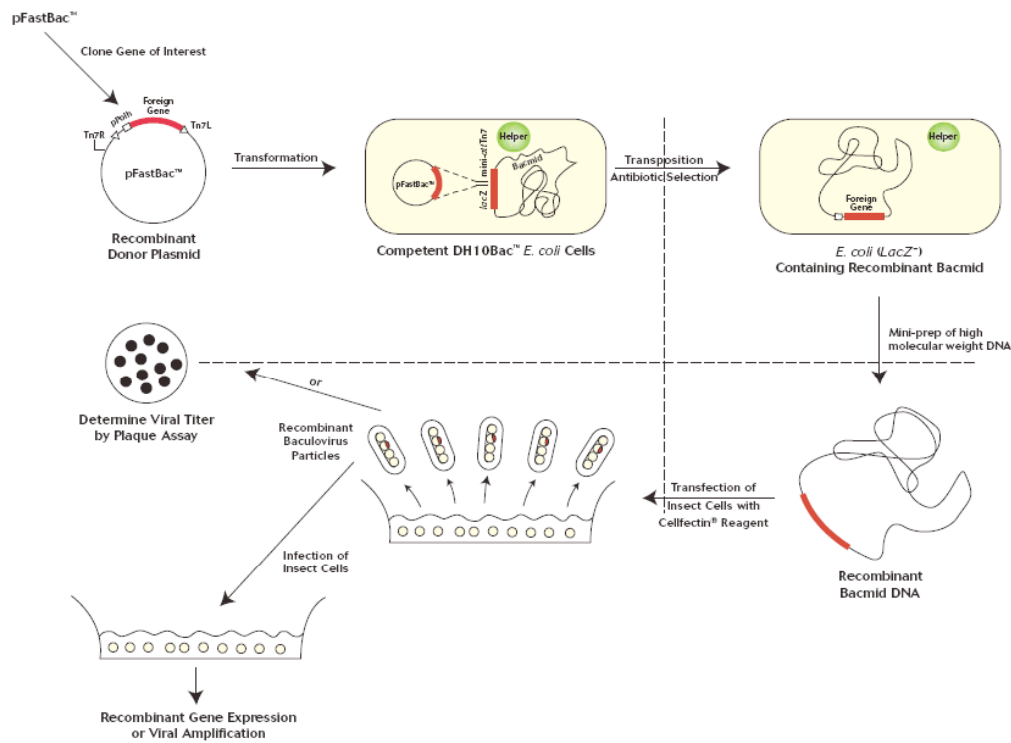
### **I. Expression et purification de protéines recombinantes dans les cellules**

#### ***Sf21 :***

Le système baculovirus-cellules d'insectes a été utilisé pour l'expression des protéines recombinantes. Les lignées couramment utilisées sont issues de différentes espèces, de différents tissus, à différents stades de développement. Les lignées Sf9 et Sf21, établies à partir de cellules ovariennes de pupes de *Spodoptera frugiperda*, sont les mieux connues et les plus utilisées. Ces cellules se cultivent entre 25 et 30°C, en milieu tamponné (pH de 6,2 à 6,4) sans exigence particulière en CO<sub>2</sub>. Elles peuvent croître en suspension à haute densité comme en monocouches et être adaptées à la culture sans sérum.

Cette technique est basée sur la transposition spécifique d'un transposon, contenant le gène d'intérêt, dans un bacmide qui peut se répliquer dans *E.coli* et qui contient l'intégralité du génome d'un baculovirus. Cette technique nécessite deux outils : le vecteur pFastBac et les bactéries DH10Bac (Figure 18). En effet, Il est nécessaire de passer par un vecteur plasmidique de transfert dans lequel est inséré le gène ou l'ADN complémentaire à exprimer à cause de la grande taille des génomes des baculovirus. Un vecteur de transfert classique contient le promoteur de la polyédrine avec les séquences flanquantes en amont et en aval, le cadre de lecture du gène lui-même est éliminé ou interrompu, et comporte un ou des site(s) de clonage.

Le vecteur de transfert chargé du gène d'intérêt est mélangé avec de l'ADN viral nu puis ce mélange est introduit dans les bactéries au cours d'une étape appelée cotransfection. Une recombinaison homologue peut se produire entre le vecteur de transfert et l'ADN viral qui nous permet d'obtenir les bacmides recombinants qui seront utilisés par la suite pour transférer des cellules d'insectes. Les virions recombinants qui en résultent se multiplient et donneront les stocks viraux utilisés pour l'expression des différents gènes clonés.



**Figure 18: Principes du système d’expression Baculovirus (invitogen):** Le principe de l’utilisation des baculovirus comme vecteurs de gènes étrangers consiste à remplacer la région du génome du baculovirus qui code pour la polyédrine par un gène qui code une protéine “étrangère” d’intérêt. Ainsi, un gène étranger cloné à la place de la polyédrine sera à son tour fortement exprimé. Ce clonage se fait par l’intermédiaire d’un plasmide de transfert qui contient le promoteur de la polyédrine. Le plasmide de transfert recombinant et l’ADN du baculovirus sauvage linéarisé sont co-transfectés dans les cellules d’insectes. Une recombinaison homologue entre le plasmide recombinant et le génome du baculovirus se produit ce qui permet la production de baculovirus recombinants. Les baculovirus recombinants purifiés sont alors utilisés pour infecter des cellules afin de produire en grande quantité la protéine d’intérêt.

### A. Transfection des cellules et obtention des stocks viraux :

Les bacmides (envoyés par Laurent Ruel) purifiés (1 µg) pour les constructions de FU entier, de FU entier Kinase inactive et de COS2 avec une étiquette de 6 histidines et site de coupure à la TEV sont incubés avec de la Cellfectin (Invitrogen), un puissant lipide cationique utilisé pour favoriser la transfection de l’ADN, du milieu Grace’s Insect (Invitrogen Cat.N°11595-030) sans suppléments, puis le mélange est ajouté à des cellules d’insectes Sf21 fixées dans une boites 24 puits (9.10<sup>5</sup> cellules/puits) pour effectuer la transfection. Après 5 heures

d'incubation, les cellules sont incubées dans 2 mL de milieu avec sérum pendant 72 heures pour obtenir le stock viral P1 contenu dans le surnageant. 500 µL de stock P1 sont par la suite utilisés pour transfecter 10 mL de cellules Sf21 à  $10^6$  cellules/mL. Après 72 heures d'incubation, on obtient le stock viral P2 qui est aussi utilisé pour transfecter à nouveau une culture de cellules Sf21 afin d'obtenir le stock viral P3 qui sera utilisé par la suite pour les expressions.

## **B. Titration du stock viral :**

Avant de transfecter les cellules pour lancer les surexpressions des différentes protéines, il faut s'assurer de la charge virale contenue dans les stocks que nous avons préparés. Le test est réalisé dans des boîtes 6 puits (2 mL de culture à  $1 \times 10^6$ /puits) avec le kit FastPlax Titer (Merck Cat. N°70850-3) pour les stocks viraux de FU, FU KD et COS2.

Cette technique est basée sur la détermination des titres de baculovirus en 24 à 48 heures après la transfection en suivant l'apparition de niveaux détectables de la glycoprotéine gp64 à la surface des cellules attaquées par le virus. La détection des cellules transfectées est basée sur une forte affinité des anticorps monoclonaux contre la gp64, qui sont directement ajoutés aux cellules fixées. La révélation est réalisée par un anticorps anti IgG conjugué à la  $\beta$ -galactosidase. Le développement des couleurs est réalisé avec les substrats X-Gal/NBT qui se traduit par l'apparition de plaques clairement distingués par leur couleur bleu foncé et facilement dénombrable.

Les boîtes sont incubées pendant une heure à température ambiante pour permettre aux cellules de se fixer au fond des puits et pour avoir 50% de confluence. Entre temps une série de dilutions est préparée pour chaque stock de  $10^{-2}$  à  $10^{-7}$ . Pour cela, 100 µL de stock viral de la première dilution sont dilués dans 900 µL de milieu jusqu'à l'obtention de la dernière concentration. Après incubation, le milieu dans les puits est remplacé pour 200 µL de trois dilutions des stocks viraux ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$ ) déjà préparées et en double pour chaque dilution. Les boîtes sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante. 2 mL de milieu de milieu sont rajoutés et les cellules sont incubées à 27°C pendant 24 heures. À la fin de

l'incubation, le milieu est enlevé et les cellules sont lavées avec une solution de PBS puis fixées avec une solution à 3.7% de formaldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Une étape de blocage avec une solution à 1% de gélatine est nécessaire avant d'incuber les cellules avec 1 mL d'anticorps FastPlax dilués au 1/10000<sup>ème</sup> pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite lavées et incubées pendant 1 heure avec les anticorps secondaires couplés à la  $\beta$ -galactosidase. La révélation est effectuée en rajoutant 60  $\mu$ L de chaque substrat le X-Gal et le NBT après une incubation de 15 min à 37°C. Les cellules infectées sont comptées sous un microscope grâce à leur couleur bleue. Le titre des stocks viraux (en *plaque forming unit* par mL ou pfu/ mL) est ensuite calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{pfu/mL} = 5 \times (\text{nombre de cellules comptées}) \times (\text{le facteur de dilution})$$

Le MOI (Multiplicity Of Infection) qui sera utilisé par la suite des expériences est calculé par la formule suivante :

$$\text{MOI} = (\text{volume d'inoculum} \times \text{titre viral}) / \text{nombre de cellules}$$

### **C. Test d'expression :**

Les tests d'expression ont été réalisés dans des plaques 24 puits avec  $6.10^5$  cellules/puits dans 300  $\mu$ L de milieu avec sérum. Les cellules ont été incubées avec différents volumes du stock viral P3 (1, 2, 5, 10, 20 et 50  $\mu$ L) pendant 24, 48 et 72 heures à 27°C. Le surnageant est ensuite enlevé et les cellules ont été lavées avec du PBS puis resuspendues dans du bleu de charge. Le contenu protéique a été analysé sur gel d'acrylamide 12%.

## **D. Culture :**

### **1. Expression des protéines seules :**

L'expression des protéines est réalisée en suspension dans des erlens de 1 L. En effet, les cellules sont d'abord cultivées dans des boîtes de 10 mL de milieu de culture pour préparer une préculture avec un grand nombre de cellules viables. Le nombre de boîtes utilisées dépend du volume de la préculture à préparer. Ainsi pour préparer une culture de 200 mL nous avons préparé une préculture de 80 mL à  $3 \times 10^6$  cellules/mL. Cette préculture est ensuite diluée dans du milieu de culture neuf additionné de sérum pour avoir 200 mL de culture à  $1 \times 10^6$  cellules/mL auxquels sont rajoutés les différents volumes de stocks viraux en fonction des concentrations (2 et 1.2 mL de stock P3 pour COS2 et FU respectivement). Les cultures sont incubées à 27 °C sous agitation à 80 tpm pendant 48 heures.

### **2. Co expression FU/COS2 :**

Pour sur exprimer les deux protéines COS2 et FU en même temps et dans la même culture, nous avons décidé de transfecter les cellules Sf21 avec les deux stocks viraux. Pour cela j'ai préparé une culture de 200 mL comme pour l'expression des protéines seules et j'ai transfecté avec 2 mL de P3 de COS2 et 2 mL de P3 de FU WT ou KD. La culture est ensuite incubée sous agitation pendant 48 heures à 27°C.

## **E. Purification :**

### **1. Purification COS2 :**

200 mL de culture ont été centrifugés à 2000 tpm puis le culot a été repris dans 9 mL de tampon de lyse (Phosphate 20 mM pH 7.5, NaCl 1 M additionné d'un cocktail d'antiprotéases : 1 mg/mL d'Aprotinine, Leupeptine, Pepstatin, Antipain et 1M Benzamidine) puis 4 cycles de congélation/décongélation ont été réalisés pour lyser les cellules à 4°C. Une légère sonication de 9 sec (3 sec ON/ 3 sec OFF) à 20% d'intensité est réalisée pour optimiser la lyse. Après centrifugation à 13200 tpm pendant 1 heure, le surnageant obtenu est injecté sur une colonne de



Nickel de 1 mL (Histrap Ge Healthcare) équilibrée dans le tampon additionné de 10 mM d'imidazole. Après les lavages, la protéine a été éluée avec un gradient de tampon de lyse additionné de 300 mM d'imidazole dans des fractions de 500 µL. Les différentes fractions éluées sont contrôlées sur gel d'acrylamide 10% par SDS-Page et par western blot avec des anticorps anti COS2.

## **2. Purification FU :**

200 mL de culture ont été centrifugés à 1800 g puis le culot a été repris dans 6 mL de tampon de lyse (Hepes 40 mM pH 7.5, NaCl 350mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Glycérol 5% et des antiprotéases) puis 4 cycles de congélation/décongélation ont été réalisés pour lyser les cellules à 4°C. Après centrifugation à 13200 tpm pendant 1 heure, le surnageant obtenu est injecté sur une colonne de Nickel de 1ml (Histrap Ge Healthcare) équilibrée dans le tampon additionné de 20 mM d'imidazole. Après les lavages, la protéine a été éluée avec un gradient de tampon de lyse additionné de 300 mM d'imidazole dans des fractions de 500 µL. Les différentes fractions éluées sont contrôlées sur gel d'acrylamide 10% par SDS-Page et par western blot avec des anticorps anti FU.

## **3. Purification de la Coexpression FU et COS2 :**

200 mL de culture ont été centrifugés à 2000 tpm puis le culot a été repris dans 20 mL de tampon de lyse (phosphate 50 mM pH 7.5, NaCl 1.4 M additionné d'antiprotéases) puis 5 cycles de congélation-décongélation et une sonication de 9 sec (3 sec ON/ 3 sec OFF) à 30% d'intensité ont été réalisés pour lyser les cellules à 4°C. Après centrifugation à 13200 tpm, le surnageant obtenu est incubé pendant une heure avec 300 µL de résine TALON (Ge Healthcare) équilibrée dans le tampon de lyse avec 30 mM d'Imidazole puis déposé sur la colonne. Après les lavages successifs de la résine, la protéine a été éluée avec le tampon de lyse additionné de 500 mM imidazole dans des fractions de 500 µL. Les différentes fractions éluées sont contrôlées sur gel d'acrylamide 10% par SDS-Page et par western blot avec des anticorps anti FU et anti COS2.

## **II. Clonage, Expression et Purification des protéines exprimées chez *E. Coli* :**

### **A. Clonage Gateway :**

La technique de clonage Gateway est une méthode de clonage universel qui se base sur les propriétés de recombinaison dite « site spécifique » du bactériophage lambda. Cette technique permet de fournir un moyen rapide et très efficace pour déplacer notre gène d'intérêt dans différents vecteurs pour tester des systèmes d'expression multiples. Le système TOPO® Cloner d'Invitrogen permet d'introduire des produits de PCR avec des bouts cohésifs dans l'un des vecteurs pour générer ainsi un clone d'entrée. Pour introduire les inserts ce système utilise la Topoisomérase I de *Vaccinia* virus qui est fixée directement sur le vecteur d'entrée. Cette protéine se lie à l'ADN double brin des inserts sur le site spécifique (CCCTT) que nous avons introduit par PCR sur les fragments et clive la liaison phosphodiester sur un brin. L'énergie ainsi générée est conservée par la formation d'une liaison covalente entre le Phosphate en 3' du brin clivé et le résidu Tyrosine 274 de la Topoisomérase I. Ce lien entre l'ADN et l'enzyme peut ensuite être attaqué par l'hydroxyle en 5' du brin clivé en inversant la réaction ce qui permet de libérer la Topoisomérase. Avec ce système, les inserts peuvent être clonés dans la bonne orientation avec des rendements égaux ou supérieurs à 90%.

Différentes constructions des protéines SUFU, MLF, CI et COS2 ont été clonées avec le système Gateway. Le tableau 3 résume les différents oligonucléotides et vecteurs utilisés pour cloner et exprimer ces différentes constructions.

Constructions	Oligonucléotides	Vecteurs D'entrée	Vecteurs d'expression
SUFU	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTGC CGAGGCGAATTGGAC Anti-Sens : TTATCACATTTTCAGAGGAGCAGC	pENTER-D- TOPO	pDEST17
MLF	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTTC TTTATTTCGGAGCGTTGATGG Anti-Sens:TTACTACTTCTTCTTGCCGCGCT TGACC	pENTER-D- TOPO	pDEST17 pGET20A pGET30A
MLF-C1 (aa 82-aa 202)	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTAT GATGCCAAACTTTAATCGCC Anti-Sens :TTAGCGACTAGCGCGCATGTAA ACTCCC	pENTER-D- TOPO	pDEST17 pGET30A
MLF-C2 (aa 82-aa 218)	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTAT GATGCCAAACTTTAATCGCC Anti-Sens :TTACATGATGGCCTGCATGCCACC	pENTER-D- TOPO	pDEST17 pGET30A
MLF-C3 (aa 82-aa 245)	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTAT GATGCCAAACTTTAATCGCC Anti-Sens :TTATACACAGTCATCATCG	pENTER-D- TOPO	pDEST17 pGET30A
MLF-C4 (aa 1-aa 175)	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTTC TTTATTTCGGAGCGTTGATGG Anti-Sens :TTACAGTTGTCTGAGCGCAT GTCC	pENTER-D- TOPO	pDEST17 pGET30A
CI-R	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTGA CGCCTACGCGTTACCTAC Anti-Sens : CTAGTCACAAATTCAGCCA TCATC	pENTER-D- TOPO	pDEST17/pGET20A pGET30A/pGET41A
COS2-C1 (aa 1-aa 420)	Sens :CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTGA AATACCCATTTCAGTTAGCG Anti-Sens :TTAAGAGGAATTGGATTCCGGG	pENTER-D- TOPO	pDEST17

**Tableau 3 :** Différents oligonucléotides et vecteurs utilisés pour le clonage des protéines HH.

Les différents oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier les différents fragments d'ADN par PCR à partir du cDNA (ADN codant) qui code pour chaque protéine. Les réactions PCR ont contenu 0,2 mM dNTP, 0,5  $\mu$ M de chaque amorce, 10 ng de cDNA, tampon de l'enzyme 1X, 0,02 U/ $\mu$ L d'enzyme iProof (Biorad). Les amplifications ont été réalisées dans le thermocycleur iCycler (Biorad) en utilisant la programmation suivante : une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 min suivie de 30 cycles d'amplification (95°C pendant 30 sec, hybridation pendant 1min à 55°C et 72°C pendant 1 min/ kbases d'ADN) suivi d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

### **1. 1<sup>ère</sup> Réaction de clonage :**

Cette première étape permet d'introduire nos fragments d'ADN amplifiés dans le premier vecteur de clonage. Les inserts amplifiés ont été purifiés par la suite avec le kit Extract II (Macherey Nagel Cat.N° 740.609.50) et utilisés pour réaliser la première réaction de clonage avec le Kit d'Invitrogène (Cat.N°45-0218). Le vecteur utilisé est le pENTER/ D-TOPO. 50 ng de produits PCR purifiés sont utilisés pour cette réaction auxquels on rajoute : 1 µL de solution saline, 1 µL TOPO Vecteur et 2 µL de H<sub>2</sub>O pour un volume final de réaction de 6 µL. Après incubation pendant 5 min à température ambiante du mélange, j'ai procédé à la transformation des bactéries compétentes (One Shot chemically competent *E.coli* cells). 2 µL de produit de réaction sont utilisés pour transformer 50 µL de cellules compétentes. Elles sont ensuite incubées pendant 30 min dans la glace puis 30 sec à 42°C.

Enfin, 250 µL de milieu S.O.C. sont rajoutés et les tubes sont incubés 1 heure à 37°C. 250 µL de produits de transformation sont étalés sur une boîte LB-Agar additionnée de kanamycine (concentration finale : 50 µg/mL) et incubée à 37°C sur la nuit. Le lendemain, une PCR sur colonies, pour cribler 6 clones isolés est réalisée : chaque clone est repiqué dans 10 µL de H<sub>2</sub>O stérile, 2 µL sont étalés sur une boîte LB + Kanamycine et 5 µL seront utilisés pour la PCR auxquels nous rajoutons 0,2 mM dNTP, 1 µM de chaque amorce du vecteur M13, tampon de l'enzyme 1X, 0,025 U/µL d'enzyme Dream Taq (Fermentas). L'amplification est réalisée avec le programme suivant : une étape de dénaturation à 95°C , pendant 10 min, suivie de 30 cycles d'amplification (95°C pendant 30 sec, hybridation pendant 1 min à 55°C et 72°C pendant 1 min/ kbases d'ADN) suivi d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

Un des clones positifs est alors repiqué dans 5 mL de milieu LB liquide avec de la kanamycine est incubé sur la nuit à 37°C pour faire une mini-préparation et pour extraire le vecteur avec notre insert avec kit Extract II (Macherey- Nagel) et passer à la deuxième étape de clonage.

## 2. 2<sup>ème</sup> Réaction de clonage:

Une fois le vecteur d'entrée obtenu, la construction peut être introduite dans de nombreux vecteurs d'expression par une recombinaison homologe entre le vecteur d'entrée et le vecteur de destination. Pour obtenir notre vecteur d'expression avec notre construction, nous avons réalisé une deuxième étape de clonage. Pour cela, 1.5 µL de mini-préparation de notre vecteur d'entrée avec l'insert sont mélangés avec 0.5 µL de tampon Tris-EDTA, 2 µL de notre vecteur de destination et 1 µL de l'enzyme LR II clonase (Invitrogen). Ce mélange est alors incubé pendant 4 heures à température ambiante et la totalité de la réaction est utilisée pour transformer les cellules compétentes DH5α qui seront étalées sur une boîte LB Agar additionnée d'Ampicilline (concentration finale : 100 µg/µL).

Une deuxième PCR sur colonies sur 6 clones isolés est alors réalisée avec les oligonucléotides sens et anti-sens de la construction pour identifier les clones positifs et lancer par la suite les cultures pour effectuer les mini préparations avec le kit Plasmids Extract II (Macherey- Nagel Cat.N° 740.588.50) afin d'obtenir notre vecteur d'expression purifié. Ces vecteurs seront par la suite envoyés pour le séquençage afin de vérifier les constructions. Un test d'expression est alors réalisé pour déterminer les conditions optimales d'expression.

### B. Clonage Gateway pour coexpression MLF-SUFU :

C'est une technique basée sur l'obtention d'une cassette de clonage contenant les deux gènes codant pour nos protéines d'intérêt en série avec des séquences complémentaires qui permettent d'hybrider les deux gènes ensemble. Pour cela il faut synthétiser les oligonucléotides Sens pour le gène n°1, Anti-sens du gène n°2 et les oligonucléotides intermédiaires comme suit :

Oligonucléotides sens	Environ 25 bases du gene1-TAA AAAAAGGAGAAAAAAT GAAA-environ 25 bases du gene2
Oligonucléotides anti sens (complémentaire du précédent)	Environ 25 bases du gene2-CAT TTTTCTCCTTTT TTA – environ 25 bases du gene1

**Tableau 4 :** Modèles d'oligonucléotides à utiliser pour le clonage d'une cassette de deux gènes.

En se basant sur ce principe nous avons synthétisé les oligonucléotides suivants (Tableau 5) pour l'expression de la construction His-TEV-SUFU-Linker-MLF :

Oligonucléotide SUFU sens	CACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTGCCGAGGCGAATTG GAC
Oligonucléotide intermédiaire sens	CGACGCTGCTCCTCTGAAAATGTGATAAAAAAAGGAGAAA AA ATGAAA TCTTTATTCGGAGCGTTGATGGGTG
Oligonucléotide intermédiaire anti sens	CACCCATCAACGCTCCGAATAAAGATTTTCATTTTTCTCCTT TTTTATCACATTTTCAGAGGAGCAGCGTCG
Oligonucléotide MLF anti sens	TTACTACTTCTTCTTGCCGCGCTTGACC

**Tableau 5:** Oligonucléotides utilisés pour l'obtention de la cassette de clonage pour la co-expression de SUFU et MLF.

Une première PCR a pour but d'amplifier les deux gènes séparément avec des « linker » complémentaires. Le mélange réactionnel est décrit dans le tableau suivant :

	PCR1	PCR2
Plasmide pGEX 4T MLF	10 ng	-
Plasmide pGEX 4T Sufu	-	10 ng
Oligo sens	0.5 µM	0.5 µM
Oligo antisens	0.5 µM	0.5 µM
Tampon 10X iproof	1X	1X
dNTP	0.2 mM	0.2 mM
H2O	Qsp 50µl	Qsp 50µl
iProof	0,02U/µl	0,02U/µl

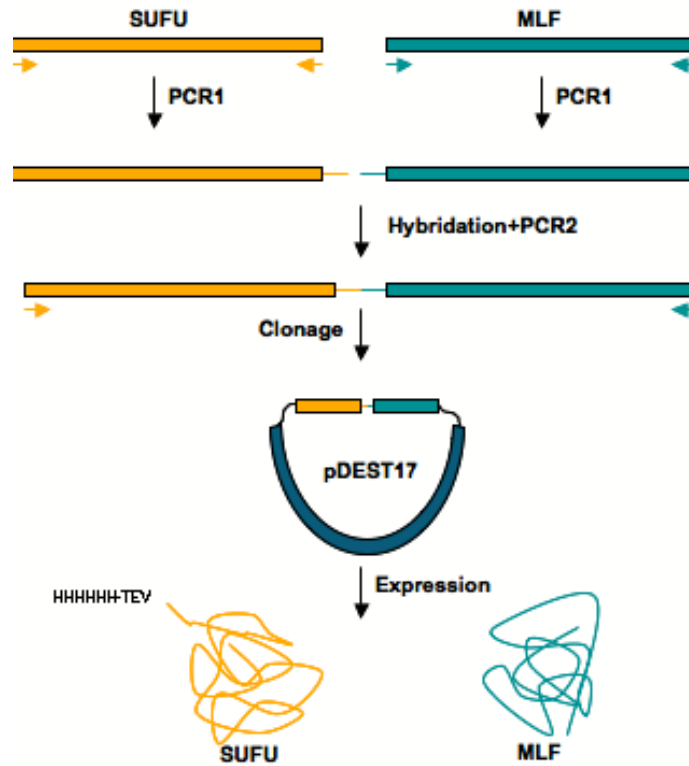
**Tableau 6:** Réactions PCR pour l'amplification des genes avec les oligonucléotides spécifiques.

Une deuxième PCR, dont le mélange est décrit dans le tableau 7, a pour but d'amplifier le fragment avec les deux gènes en série après hybridation des « linkers » complémentaires :

	PCR1-2
PCR1	1 $\mu$ L
PCR2	1 $\mu$ L
Oligo sens	0.5 $\mu$ M
Oligo antisens	0.5 $\mu$ M
Tampon 10X iproof	1X
dNTP	0.2 mM
H2O	Qsp 50 $\mu$ L
iProof	0,02U/ $\mu$ L

**Tableau 7:** Réaction PCR pour l'amplification de la cassette des deux gènes après hybridation.

Cette dernière PCR nous donnera le fragment final à insérer dans les vecteurs d'entrée et de destination du clonage Gateway. Pour introduire la cassette de clonage dans le vecteur d'entrée nous avons utilisé aussi le Kit d'Invitrogen (Cat.N°45-0218). Les deux étapes de clonage ont été réalisées dans les mêmes conditions que décrit plus haut. La figure 19 résume les différentes étapes de cette méthode :



**Figure 19: Principes du clonage pour la coexpression des protéines SUFU et MLF.** Les deux gènes sont d'abord amplifiés séparément par des PCR utilisant les amorces spécifiques. Ensuite une étape d'hybridation permet de lier les deux gènes en série grâce aux « linkers » introduits par PCR. La cassette entière est amplifiée par PCR ensuite introduite dans un vecteur d'entrée pour le clonage Gateway. La deuxième réaction de clonage nous permet d'obtenir notre cassette dans un vecteur d'expression. Un test d'expression nous permettra de vérifier la coexpression des deux protéines. La protéine SUFU sera exprimée avec une étiquette de 6-histidines en N-terminal alors que la protéine MLF ne porte pas d'étiquette. Sens: Oligonucléotide sens; Anti-sens: Oligonucléotide anti-Sens; PCR: Réaction d'amplification des fragments d'ADN.

### C. Clonage Classique :

Pour exprimer FU en bactérie, les constructions suivantes sont clonées: Construction1 : Domaine catalytique (aa 1-aa 328), Construction2 : Domaine charnière + Régulateur (aa 409-aa 805), Construction3 : Domaine régulateur (aa 506-aa 805) et la protéine entière. Ces constructions ont été clonées dans les vecteurs: pGEX-CS-FA avec GST en N-terminal ou pET-HT-TEV avec une étiquette 6-Histidines en N-terminal et un site de coupure à la TEV.

Les clonages des constructions de FU entier ou de ses domaines kinase et régulateur ont été effectués par le système de clonage FA (rapporté de l'institut Curie par Alexis Gautreau) qui



permet d'introduire les inserts entre deux sites de restrictions très rares des enzymes FseI et AscI dans le vecteur d'expression. Les sites de restriction de ces deux enzymes sont les suivants :



Ces sites ont été introduits sur nos séquences par PCR avec des amorces spécifiques. La suite du clonage a été effectuée par la plateforme de clonage du laboratoire (par Véronique Henriot).

#### **D. Mutagenèse Dirigée :**

Pour réaliser la mutagenèse dirigée sur le domaine kinase de la protéine FU, j'ai utilisé le kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent technologie Cat.N°200523) qui permet de créer des mutations ponctuelles en modifiant la nature d'un acide aminé, ou d'insérer/supprimer un ou plusieurs acides aminés. Cette méthode utilise les performances de la Polymérase à ADN *PfuUltra* qui réplique les deux brins d'un ADN plasmidique avec une haute fidélité à partir de deux oligonucléotides synthétiques contenant chacun la mutation désirée. Ces oligonucléotides sont complémentaires entre eux et s'hybrident sur chacun des brins du plasmide. Ils sont allongés par la Polymérase à ADN *PfuTurbo* et génèrent un plasmide muté. Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *DpnI* qui reconnaît spécifiquement l'ADN méthylé ou hémi-méthylé.

L'ADN parental, non porteur de la mutation, est ainsi éliminé sélectivement. À l'issue de cette digestion, l'ADN plasmidique fraîchement synthétisé est introduit par transformation chez la bactérie *E. coli* qui répliquera le plasmide mutant.

Deux mutations ont été introduites : S159A avec comme matrice le vecteur du domaine kinase de FU et T158AS159A avec comme matrice le vecteur FU AS (Fukumoto et al., 2001) donné gracieusement par Anne Plessis) qui contient déjà la mutation T158A. Nous avons défini les amorces nécessaires (Tableau 8) en utilisant le programme Quickchange Primer Design sur le site d'Agilent Technologie (<http://www.genomics.agilent.com>), les amorces obtenues sont définies dans le tableau suivant :

Constructions	Amorces Sens	Amorces Anti-Sens	Matrices
FU Domaine Kinase S159A	CCCACGTGCTCACCGCGATCA AGGGAACG	CGTTCCTTGATCGCGGTGAGCACGTG GG	FU pGEX-CS
FU Domaine Kinase T158A/S159A	CCACGTGCTCGCCGCGATCAA GGGAAC	GTTCCCTTGATCGCGGCGAGCACGTGG	FU AS pGEX-CS

**Tableau 8:** Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée sur FU pour l'obtention des mutants S159A et T158A /S159A.

Pour cela, 25 ng de chaque plasmide sont mélangés avec 125 ng de chaque amorce sens et anti-sens comportant la mutation voulue, 0,2 mM de dNTP, 1X de tampon de l'enzyme, 0,02 U/ $\mu$ L de la polymérase *PfuUltra* HF et H<sub>2</sub>O pour un volume final de 50  $\mu$ L. Les vecteurs sont alors amplifiés par PCR avec le programme suivant selon les recommandations du kit : un cycle à 95°C pendant 30 sec et 16 cycles avec une étape de 30 sec à 95°C, une étape à 55°C pendant 1 min et une étape à 68°C pendant 6 min. Les tubes sont ensuite placés dans la glace pendant 2 min pour les refroidir. 1  $\mu$ L de la DNase DpnI, qui va digérer l'ADN parental, est rajouté au mélange qui sera incubé pendant une heure à 37°C.

50  $\mu$ L de cellules compétentes *XLI-Blue* sont transformées avec 1  $\mu$ L de réaction après digestion. Les cellules sont alors incubées dans la glace pendant 30 min, puis subissent un choc thermique de 45 sec à 42°C et sont refroidies pendant 2 min dans la glace. 500  $\mu$ L de milieu S.O.C sont ajoutés et les tubes sont incubés 1 heure à 37°C. 250  $\mu$ L de produits de transformation sont étalés sur une boîte LB-Agar additionnée d'Ampicilline (100  $\mu$ g/mL final) et incubés à 37°C sur la nuit.

Le lendemain deux clones par mutant sont repiqués pour lancer des précultures de 5 mL additionnées d'Ampicilline qui seront incubées sur la nuit à 37°C. Les plasmides sont ensuite purifiés sur colonne (Kit Machrey Nagel Plasmid) et envoyés pour le séquençage.

Après vérification des séquences, les bons clones sont utilisés pour transformer les souches d'expression (*Rosetta pLysS*). Les protéines sont exprimées dans les mêmes conditions que la protéine sauvage.

## **E. Expression des protéines recombinantes :**

### **1. Analyse des fractions protéiques par Electrophorèse en conditions dénaturantes:**

Cette technique est couramment appelée « SDS-PAGE ». Elle permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire ainsi que d'estimer leur degré de pureté. Elle peut également être utilisée sur des cellules entières afin de contrôler le taux de surexpression d'une protéine. Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant préalablement à leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. En présence de 2-mercaptoéthanol et de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), toutes les sous-unités polypeptidiques des protéines perdent leurs ponts disulfures, sont dénaturées et forment des micelles avec le SDS. Toutes les micelles présentent alors une charge négative proportionnelle à la masse moléculaire.

Les échantillons protéiques sont alors dilués dans deux à cinq volumes de tampon de dénaturation (Tris-HCL 0.6 M pH 6.8, Glycérols 30%, bleu de Bromophénol 1%, SDS 20%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 mM) puis chauffés pendant 3 min à 95°C avant d'être déposé sur le gel. Les gels sont préalablement coulés et polymérisés avec un pourcentage d'acrylamide dépendant de la taille de notre protéine. La migration est réalisée sous une tension de 200 V et 25 mA pendant 1 heure en utilisant le système Mini-Protean II (BIORAD). Les gels sont ensuite révélés avec le réactif Instant Blue (Expedeon). Cette technique a été utilisée pour l'analyse de toutes les protéines étudiées.

### **2. Test d'expression :**

Après vérification des clones, un test d'expression est réalisé pour déterminer les conditions optimales d'expression et de solubilité des protéines recombinantes. Pour cela nous faisons varier 4 paramètres: les souches d'expression dans *E. coli* (*Rosetta pLysS* (DE3) et *BL21 GOLD* (DE3)), la température d'induction et de culture (25°C, 20°C et 17°C), les milieux de culture (2YT ou LB) et la concentration d'IPTG (0.1mM ; 0.2mM et 0.5mM final). Une transformation

bactérienne dans les souches chimiquement compétentes sélectionnées est réalisée. Différents volumes (entre 100 et 250  $\mu\text{L}$ ) ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture solide LB-agar supplémenté d'ampicilline 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  seul ou avec du chloramphénicol 34  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les souches *Rosetta pLysS*.

Les boîtes ont été ensuite incubées pendant la nuit à 37 °C. Une préculture de 10 mL de 2YT ou de LB est ensuite préparée avec les antibiotiques adéquats et inoculée avec un clone isolé par souche. Ces précultures sont ensuite incubées à 37°C toute la nuit sous agitation. Le lendemain, une culture de 60 mL de milieu (2YT ou LB) avec les antibiotiques adéquats est inoculée avec 1/50<sup>e</sup> de préculture de la veille avec la souche adéquate arrivée à saturation. À partir de chaque culture, on distribue 4 mL de milieu dans les puits d'une boîte 24 puits stériles en fonction du nombre de paramètres que nous voulons tester. Le premier puits pour chaque culture est utilisé pour suivre l'absorbance et par la suite pour le contrôle non induit. Quand la densité optique (DO) à 600 nm est arrivée à 0.6 pour les deux souches, nous avons alors induit l'expression avec les différentes concentrations d'IPTG et incubé les boîtes à 20°C, 25°C et 17°C sur la nuit.

### **3. Arrêt des cultures et analyse sur gel :**

Le lendemain, 1 mL de culture est centrifugé 10 min à 5000 tpm. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (Tris 50mM pH8, NaCl 150 mM, imidazole 10 mM, pH 8). Les culots resuspendus sont alors soniqués pendant 30 sec à une puissance de 15% avec une microsonde, puis centrifugés pendant 15 min à 13000 tpm à 4°C. Nous prélevons ensuite le surnageant et nous ajoutons 50  $\mu\text{L}$  de LBS 5X (tampon de charge). Le culot est resuspendu dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse auxquels nous ajoutons 25  $\mu\text{L}$  de LBS 5X. 10  $\mu\text{L}$  pour le culot et 15  $\mu\text{L}$  pour le surnageant sont alors analysés sur gel d'acrylamide en condition dénaturante (SDS PAGE).

#### **4. Surexpression des protéines:**

La surexpression des protéines recombinantes a été faite dans les souches *E. coli*, *BL21-STAR* ou *Rosetta pLysS*. Une préculture a été préparée en repiquant une colonie dans 250 mL de milieu de culture LB liquide additionné des antibiotiques : Ampicilline (100 µg/mL final) et Chloramphénicol (34 µg/mL final), et incubée pendant la nuit à 37 °C à 200 tpm. Le lendemain, cette préculture a servi à ensemercer une culture de six litres de milieu LB additionnés des antibiotiques Ampicilline et Chloramphénicol aux concentrations décrites plus haut. La culture a été réalisée à 37 °C sous une agitation à 200 tpm. Une fois la valeur 0,6 d'absorbance à 600 nm atteinte, la surexpression de la protéine est induite par ajout de 0.2 mM d'IPTG à 20°C sur la nuit. À la fin de l'induction, les cellules sont collectées par centrifugation à 5000 tpm pendant 15 min et les culots sont resuspendus et lavés dans le PBS (Phosphate Buffer Saline), centrifugés, séchés et congelés à -80°C en aliquotes correspondant aux culots récupérés de 1 ou de 2 litres de culture.

#### **F. Purification des protéines :**

##### **1. Colonne d'affinité:**

Les protéines portent une étiquette histidine ou sont exprimées en fusion avec la GST ce qui permet de les purifier à l'aide d'une colonne de Nickel ou des billes de Glutathion. Les culots bactériens décongelés sont resuspendus dans le tampon de lyse optimisé pour chaque construction (voir Tableau) additionné de lysozyme, d'antiprotéases et de DNase ou Benzonase, incubés pendant une heure à 4°C sous agitation puis soniqués. Après centrifugation à 18 000 tpm, le surnageant qui contient notre protéine est incubé pendant 1 heure sous agitation avec la résine de Nickel Sépharose par gravité ou injecté sur une colonne de Nickel (Histrap GE Healthcare) sur un système Akta purifier (GE Healthcare) équilibrée dans le tampon de lyse additionné de 20 mM d'imidazole. Après lavages avec le tampon de lyse jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit nulle, la protéine est éluée avec le même tampon de lyse additionné de 300 mM d'Imidazole pour les colonnes de Nickel ou de 12 mM de Glutathion pour les billes de Glutathion. Les différentes fractions éluées sont contrôlées sur gel par SDS-Page.

La protéine FU sauvage et ses mutants ne sont pas très stables et sont surexprimées avec une chaperonne de *E.coli* GroEL et sa Co-chaperonne GroES qui contaminent nos protéines et restent en complexe avec FU jusqu'à la dernière étape de purification. Nous avons découvert ce problème tardivement, car la construction de Fu-GST et GroEL migrent sur gel à des masses apparentes très proches. Pour éviter que ces protéines ne faussent nos résultats nous avons adapté un protocole déjà décrit (Rohman and Harrison-Lavoie, 2000). Le but est de donner à la chaperonne un mélange de protéines dénaturées en présence d'ATP, ce qui va la contraindre à replier ces protéines et donc à se détacher de FU ou de ses mutants. Pour cela les culots cellulaires obtenus à partir de 8 litres de culture sont repris dans 200 mL de tampon de lyse (Hepes 100 mM pH 7.5, NaCl 400 mM, DTT 10 mM, Glycérol 10% et des anti-protéases). Les cellules sont lysées d'abord par l'ajout de lysozyme (0.5 mg/mL) et de la Benzonase (0.05 mg/mL) sous agitation à 4°C pendant 1 heure 30 min puis par une sonication pendant 2 min avec une intensité de 40 % (20 sec ON/ 20 sec OFF).

Le lysat obtenu est ensuite centrifugé à 11000 rpm pendant 25 min et le surnageant obtenu est incubé à 37°C avec 10 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> et 1.2 mL d'extraits cellulaires de *E. coli* dénaturés avec 6M d'urée. Après incubation, le mélange est incubé avec un 1 mL de résine Glutathion Sépharose 4B (GE Healthcare) pendant 1 heure 30 min à 4°C et sous agitation.

Après dépôt sur colonne et récupération du non retenu sur les billes, la résine est lavée avec du tampon de lyse jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit nulle. La protéine est éluée dans des fractions de 3 mL avec du tampon de lyse additionné de 12 mM de glutathion réduit. Les fractions d'éluion sont par la suite analysées sur gel d'acrylamide 12 %.

## **2. Colonne d'exclusion moléculaire:**

Une deuxième étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée. En effet, cette étape permet d'estimer l'état d'oligomérisation de la protéine (un étalonnage de la colonne avec des protéines globulaires de poids moléculaire connu permet de d'estimer le poids moléculaire de chaque pic élué) et d'améliorer la purification en éliminant la forme agrégée. L'échantillon concentré, jusqu'à un volume de 500  $\mu$ L sur unité de filtration : Vivaspin-10000 MW (centrifugation à 5000 tpm), et centrifugé pour éliminer les agrégats éventuels, est déposé sur une colonne de tamis moléculaire : Superdex-200 Hiload 10/300, Superose 6 Hiload 10/300 ou Sephacryl 100 XK ou Superdex 200 Amicon. Les colonnes ont été équilibrées au préalable avec le tampon approprié. Les fractions d'élution sont analysées par SDS-PAGE.

## **3. Colonne échangeuse d'ions:**

Pour certaines protéines, une colonne échangeuse d'ions est nécessaire pour éliminer quelques contaminants et pour obtenir une protéine plus pure. Pour cela, après purification sur colonne d'affinité, la protéine est dialysée contre un tampon sans NaCl pour éliminer le sel se trouvant avec notre protéine et favoriser sa fixation sur la colonne. L'échantillon est par la suite injecté sur une colonne MonoQ ou une MonoS (GE Healthcare) en fonction du point isoélectrique théorique de notre protéine. L'élution est réalisée avec un gradient de tampon contenant 1M de NaCl. Le tableau 9 résume les différentes constructions caractérisées pendant ma thèse ainsi que les étapes de purification pour chaque protéine et les différents tampons utilisés :

Protéines	Masse Moléculaire (Da)	Coefficient d'extinction molaire 280nm	Tampon de lyse	Tampon Gel filtration
SUFU-His	56167	64860	Tris 50 mM pH8 ; NaCl 100 mM ; Glycérol 5% ; Imidazole 20 mM	Tris 10 mM pH 8 ou HEPES 10 mM pH 7.4 ; NaCl 100 mM; $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM
MLF-GST	61388	50685	Phosphate 50 mM pH8.5 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 5% ; EDTA 1 mM ; DTT 2 mM	-
MLF-His-C2	18500	7450	Tris 20 mM pH8 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 5% ; Imidazole 20 mM	Hepes 10 mM pH 7.5 ; NaCl 200 mM ; $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM
MLF-His-C3	21400	7450	Tris 50 mM pH8 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 5% ; $\beta$ -OG; Imidazole 20 mM ; DTT 2 mM	Tris 50 mM pH8; NaCl 300mM ; Glycérol 5% ; $\beta$ -OG; 2 mM $\beta$ -mercaptoéthanol
SMO-His	35406	5960	Hepes 50 mM pH 7.5 ; NaCl 200 mM ; Glycérol 5% ; Imidazole 20 mM ; DTT 1 mM	Hepes 50 mM pH 7.5 ; NaCl 200 mM ; Glycérol 5% ; $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM
CI-R-GST	105810	92140	Tris 50 mM pH7.5 ; NaCl 200 mM ; Glycérol 10% ; EDTA 1 mM ; DTT 2 mM	Tris 50 mM pH8 ; NaCl 200mM ; Glycérol 10% ; 2 mM $\beta$ -mercaptoéthanol
FU Domaine kinase-GST FU S159A-GST FU T158A/S159A-GST	63345	75010	Hepes 50 mM pH 7.5 ; NaCl 400 mM ; Glycérol 5% ; DTT 10 mM	Hepes 50 mM pH 7.5 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 5% ; $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM
COS2 (aa1- aa420)-His	48654	31860	Tris 50 mM pH8 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 5% ; Imidazole 20 mM	Tris 10 mM pH 8; NaCl 100 mM ; $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM

**Tableau 9:** Différentes constructions caractérisées ainsi que les différentes étapes de leurs purifications.



## G. Mesure de la concentration des protéines purifiées:

Les molécules biologiques contenant des noyaux aromatiques, des doubles liaisons conjuguées ou des métaux de transition présentent un spectre d'absorption caractéristique en solution. La mesure des concentrations des différentes protéines utilisées est alors réalisée par un dosage spectrophotométrique UV-Visible par le spectrophotomètre Eppendorff. Cette mesure se base sur l'estimation du coefficient d'extinction molaire spécifique d'après la séquence en acides aminés de chaque protéine à 280 nm en utilisant le serveur ProtParam (site SwissProt). En effet, la concentration d'un soluté est directement proportionnelle à son absorbance en solution. Cette relation est définie par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \xi \cdot l \cdot C$$

A : absorbance ou densité optique à 280nm,  $\xi$  : Coefficient d'extinction molaire (L/mol/cm), l : longueur de la cuve (cm) et C : concentration de la solution (mol/L).

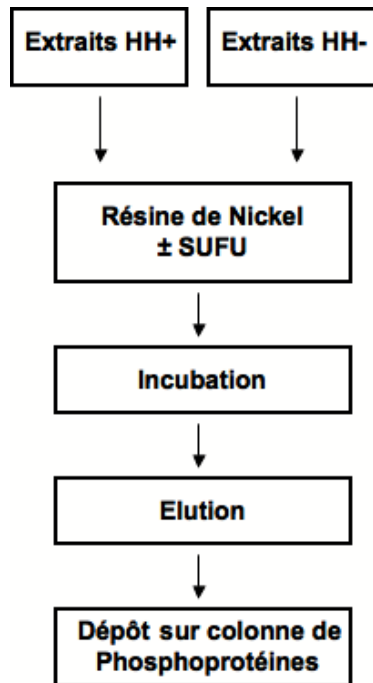
Cette méthode a été utilisée pour mesurer les concentrations des différentes protéines étudiées. Certaines protéines n'ont pas de tryptophane et donc elles ont un coefficient d'extinction molaire très faible, nous avons dû compléter les mesures avec un dosage par le réactif de Bradford.

## H. Phosphorylation de SUFU par les extraits de cellules:

Pour mettre en évidence la phosphorylation de SUFU *in vitro*, la protéine recombinante purifiée est incubée avec des extraits de cellules de drosophile (les cellules Kc fournies par Matthieu Sanial et Anne Plessis). Pour cela, j'ai utilisé les culots de deux boîtes de cellules dont la voie HH n'a pas été activée et ceux des cellules dont la voie HH a été activée par le domaine N-terminal de HH dans le milieu de culture. Les deux culots ont été repris séparément dans 4 mL de tampon de lyse : Tris 50 mM pH8, NaCl 100 mM, Glycérol 5%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Cocktail Antiprotéases 1/1000 et Cocktail d'inhibiteur de phosphatases (Phosphatases Inhibition cocktail

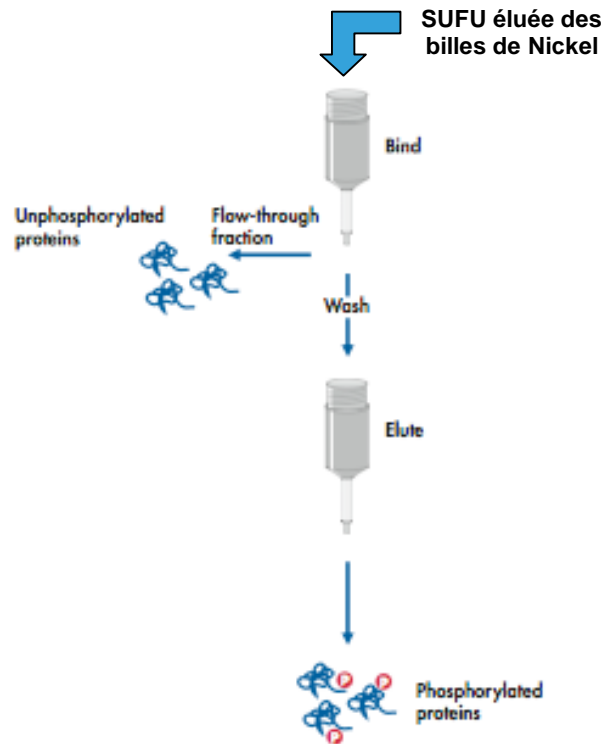
Set III, Calbiochem) 1/8. La lyse a été réalisée par 3 cycles de congélation-décongélation avec l'azote liquide et le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est obtenu par centrifugation à 13200 tpm pendant 45 min. Le surnageant de chaque culot cellulaire est séparé en deux parties. La première moitié est incubée avec 300  $\mu$ L de résine de Ni-Agarose (GE Healthcare) sur lesquelles nous avons fixé au préalable 0.25 mg de notre SUFU avec une étiquette de 6 Histidines pendant 40 min à 4°C et sous agitation. La deuxième moitié est incubée dans les mêmes conditions avec la même quantité de résine mais sans SUFU comme contrôle négatif (Figure 20).

La résine  $\pm$  SUFU avec le surnageant est ensuite incubée à 4°C pendant 1h30 et sous agitation. Après incubation, la résine est lavée avec le tampon de lyse additionné de 20 mM d'imidazole pour éliminer les fixations non spécifiques. Notre SUFU est ensuite élué avec le tampon de lyse additionné de 300 mM Imidazole dans des fractions de 500  $\mu$ L.



**Figure 20: Schémas descriptifs des différentes étapes de la méthode de phosphorylation de la protéine SUFU recombinante par les extraits de cellules de Drosophile.** La protéine SUFU est fixée sur des billes de Nickel grâce à son étiquette 6-histidine. La moitié de la résine avec SUFU est incubée avec 2 mL de surnageant des cellules HH activée. L'autre moitié est incubée avec 2 mL de surnageant de cellules HH non activée. Des contrôles sans SUFU sont réalisés dans les mêmes conditions. HH+: incubation avec des cellules où la voie HH a été activée; HH-: incubation avec des cellules où la voie HH n'a pas été activée.

Ces fractions d'élution sont ensuite déposées sur des colonnes d'enrichissement de phosphoprotéines (Pierce Phosphoprotein Enrichment Kit Cat.N° 90003). En effet, ces colonnes vont permettre la fixation de la fraction phosphorylée de SUFU et de la concentrée (Figure 21). La fraction non phosphorylée va passer à travers la colonne et va se retrouver dans les fractions de lavages.



**Figure 21: Schémas descriptifs de la concentration de la fraction phosphorylée de SUFU sur colonne de Phosphoprotéines (Kit Pierce Phosphoprotein Enrichment).** La fraction d'élution de SUFU des billes de Nickel est injectée sur une colonne qui permet de la concentrer. Les protéines non phosphorylées passent à travers les billes et seront récupérées dans le non retenu de la colonne. Les fractions phosphorylées seront retenues sur la colonne et ne seront récupérées que par élution avec un tampon spécifique. Les différentes fractions obtenues seront analysées par western blot.

Les fractions d'élution de SUFU sont diluées dans 8 mL de tampon du kit (Lysis/Binding/Wash Buffer) additionné de 0.25 % de CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate). Les fractions diluées sont ensuite déposées sur la

colonne pré équilibrée dans le même tampon et incubées sous agitation à 4°C pendant 30 min. Le non retenu est ensuite récupéré après une centrifugation de 1 min à 2000 tpm. La résine est lavée trois fois par le même tampon avec des centrifugations d'1 min à 2000 tpm. SUFU est enfin éluée avec 1 ml de tampon d'éluion après une incubation de 3 min à température ambiante. Cinq fractions d'éluion sont obtenues et sont concentrées sur jusqu'à 70 µL. La fraction concentrée ainsi que les fractions de lavages sont analysées par western blot avec des anticorps anti SUFU ou anti étiquette histidine.

## **I. Détection par Western Blot :**

Une analyse par western Blot a été réalisée afin de rechercher ou de confirmer la présence de notre protéine d'Intérêt. Pour cela, les échantillons sont d'abord séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ensuite transférés depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue à 150 mA et 250 Volts pendant 1 heure sous agitation dans le tampon de transfert (Glycine 192 mM, 2 mM Tris, éthanol 20%). La membrane est par la suite saturée avec une solution de saturation (TBS : Tris-HCl 10 mM pH8, NaCl 150 mM, Tween 0,05%, lait écrémé 5%) pendant 1 heure sous agitation. Après lavages de la membrane avec TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween 0,05%), cette dernière est incubée avec le premier anticorps, par exemple l'anticorps anti-histidine de lapin (dilution 1/1000) pendant une heure. Une deuxième incubation est par la suite réalisée, après lavages de la membrane avec du TBS-T, dans une solution contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort, par exemple anti-IgG de lapin (dilution 1/10000).

Après lavages, la membrane est incubée avec 2 mL de substrat de détection de la peroxydase par Chemiluminescence (Super Signal West PICO PIERCE) pendant 5 min et la révélation est réalisée avec l'appareil de prise d'image Fuji film. Deux clichés sont enregistrés: le premier avec 1/60 sec pour l'acquisition en épi luminescence pour prendre une photo de notre membrane avec les marqueurs de poids moléculaires et le second avec un temps adapté pour chaque blot pour la révélation de l'anticorps en Chemiluminescence. Le tableau 10 résume les différents anticorps disponibles et leurs conditions d'utilisation :

<b>Anticorps</b>	<b>Sources</b>	<b>Dilution</b>	<b>Exposition</b>
<b>Anti-6-Histidine, Lapin</b>	Santa cruz Biotechnology, Sc-803, Lot #B2506	1/1000	5 min
<b>Anti-GST, Souris</b>	Santa cruz Biotechnology, Sc-138, lot #H1104	1/1000	2 min
<b>Anti-IgG couplés HRP, Lapin</b>	Santa cruz Biotechnology, Sc-3837, lot #K1708	1/10000	-
<b>Anti-IgG couplés HRP, Lapin</b>	Santa cruz Biotechnology, Sc-2005, lot #H0406	1/10000	-
<b>Anti-phos SERINE, Souris</b>	Sigma, P3430	1/200	2 min
<b>Anti-SUFU, Lapin</b>	Donné par Anne Plessis (IJM)	1/2000	30 sec
<b>Anti-MLF, Lapin</b>	Donné par Anne Plessis (IJM)	1/2000	30 sec
<b>Anti-FUSED, Lapin</b>	Donné par Laurent Ruel	1/1000	10 sec
<b>Anti-Costal2, Lapin</b>	Donné par Laurent Ruel	1/5000	20 sec
<b>Anti-CI, Lapin</b>	Donné par Laurent Ruel	1/500	30 sec

**Tableau 10 :** liste des anticorps utilisés, leur provenance, la dilution et le temps d'exposition en Chemiluminescence.

### **III. Analyses Biophysiques :**

#### **A. Analyse de la structure en solution par dichroïsme circulaire**

##### **1. Dichroïsme circulaire avec le dichrographe JASCO :**

Dans le but de déterminer la proportion des structures secondaires des constructions de nos protéines purifiées, celles-ci ont été analysées par dichroïsme circulaire. Au préalable les protéines purifiées ont été dialysées pendant 4 h à 5 °C dans un litre de tampon (Phosphate 50 mM pH 7.4, Fluorure de sodium 50 mM) qui absorbe peu dans la gamme de longueur d'onde que nous avons utilisée afin de réaliser les mesures (185-250 nm). Le tampon a été changé au bout de 2 heures. Les protéines dialysées ont été centrifugées à 13200 tpm à 4°C pendant 15 min. Une fois le tampon changé, 200 µL d'échantillon à 0.15 mg/mL sont déposés dans une cuve de 1 mm de trajet optique puis placés dans l'appareil. Le spectre de dichroïsme est obtenu par mesure de l'ellipticité définie par l'angle dont la tangente est égale au rapport entre les axes de l'ellipsoïde de polarisation de la lumière (exprimé en mdeg) en fonction de la longueur d'onde entre 185 et 250 nm avec une vitesse de 50 nm/min. 4 spectres ont été mesurés et moyennés. Une mesure du tampon seul a été également enregistrée. Après soustraction du signal provenant du tampon et normalisation par rapport à la concentration de l'échantillon, le contenu en structures secondaires a été estimé sur le site internet Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) ou avec le programme BestSel de J. Kardoz (communication personnelle).

Ensuite la dénaturation thermique de chaque protéine a été suivie en mesurant le signal de dichroïsme à 208 ou 220 nm en appliquant un gradient de température allant de 10 à 90°C avec un incrément de 1°C.

##### **2. Dichroïsme circulaire sur DISCO :**

Afin d'étudier la stabilité de la protéine SUFU en solution, des expériences de Dichroïsme Circulaire (CD) sur la ligne DISCO du Synchrotron Soleil ont été réalisées dans trois tampons

différents afin de comparer la stabilité de la protéine. Les différents échantillons sont ensuite centrifugés pendant 30 min à 13200 rpm pour éliminer les formes agrégées, puis l'absorbance est mesurée pour évaluer la concentration de la protéine. Les expériences ont été réalisées avec des échantillons à une concentration entre 4.1 et 4.3 mg/mL. Les échantillons sont déposés dans une cuve de calcium de Fluore circulaire avec un trajet optique de 2.3  $\mu\text{m}$  et positionnée devant le faisceau dans une chambre où la température est contrôlée par un pelletier. Quatre spectres CD sont enregistrés entre 280 et 170 nm puis moyennés pour obtenir un spectre final. La dénaturation en température a été réalisée entre 15 et 95°C avec un pas de 5°C et en accumulant 3 spectres par pas. Les données sont ensuite traitées par différents programmes pour l'obtention des informations voulues : le programme CDTtools, le site Dichroweb et le logiciel Kaleidagraph.

## **B. Calorimétrie :**

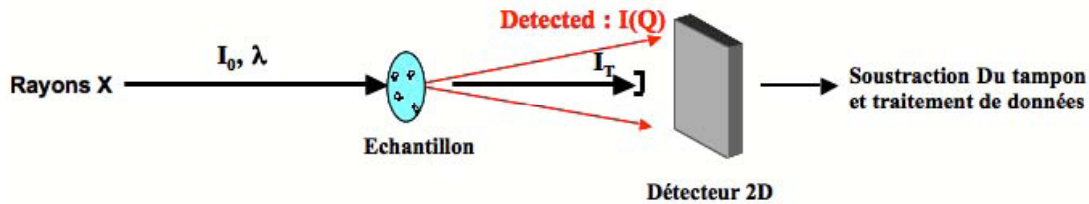
La calorimétrie à titration isothermale (ITC) est une méthode permettant de mesurer directement des enthalpies  $\Delta H$  d'interaction. C'est la méthode la plus directe pour mesurer les chaleurs échangées lors de la formation d'un complexe à température constante. Puisque la mesure consiste en une expérience de titration par fixation d'un ligand L sur une molécule M (généralement une protéine) présente dans la cellule du microcalorimètre, la constante d'association  $K_A$  et la stœchiométrie n seront également obtenues. Après chaque addition d'une petite quantité aliquote de L, la chaleur libérée (ou consommée) dans la cellule échantillon est mesurée par rapport à une cellule référence remplie de tampon. La chaleur échangée est calculée à partir de la puissance électrique ( $\text{Joules}\cdot\text{sec}^{-1}$ ) nécessaire pour maintenir strictement à la même température les deux cellules qui sont situées dans une enceinte adiabatique. L'addition de L est automatisée et s'effectue via une seringue pilotée par ordinateur.

Les mesures ont été réalisées à l'IBBMC par Magalie Nicaise sur l'appareil ITC200 à température ambiante. La protéine la moins concentrée est déposée dans la cellule dans un volume de 300  $\mu\text{L}$  et la titration est réalisée avec 40  $\mu\text{L}$  de la deuxième protéine environ 10 fois plus concentrée. Typiquement, l'appareil fait 20 injections de 2  $\mu\text{L}$  pendant 4 sec avec un intervalle de 180 sec entre chaque injection.

### C. Mesure Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) :

La diffusion des rayonnements aux petits angles est une technique peu invasive qui permet d'étudier la structure à basse résolution des particules et les corrélations entre particules comme les interactions protéine –protéine.

Au cours d'une expérience de diffusion de rayons X aux petits angles, une solution de protéine est placée dans le faisceau de rayons X. Derrière l'échantillon, à une distance variable, se trouve un détecteur qui permet de compter les photons. En effet, du fait de leur faible masse, les électrons de la protéine peuvent diffuser élastiquement, c'est à dire sans échange d'énergie, les photons qui composent le rayon X. Ce dispositif permet d'obtenir des courbes de diffusion. L'échantillon est isotrope, la protéine en solution ne privilégie pas de direction ou d'orientation particulières. Les photons mesurés par le détecteur sont donc caractérisés par l'angle  $\theta$  avec lequel ils sont déviés par la solution de protéine (figure 22).



**Figure 22: Principes de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).** Dispositif de mesure sur la ligne de lumière SWING. Notre échantillon est placé dans un faisceau de lumière avec une longueur d'onde et une intensité initiale ( $I_0$ ). La lumière sera alors diffusée par notre échantillon et sera collectée par un détecteur à 2 dimensions.

Sur les courbes de diffusion, l'intensité du faisceau diffusé est représentée en fonction du vecteur de diffusion :

$$Q=4\pi\sin\theta/\lambda$$

$Q$ = le transfert de quantité de mouvement ou vecteur de diffusion. exprimé en  $\text{\AA}^{-1}$

$\theta$ = Angle de déviation du faisceau.

$\lambda$ = longueur d'onde exprimée en  $\text{\AA}$ .

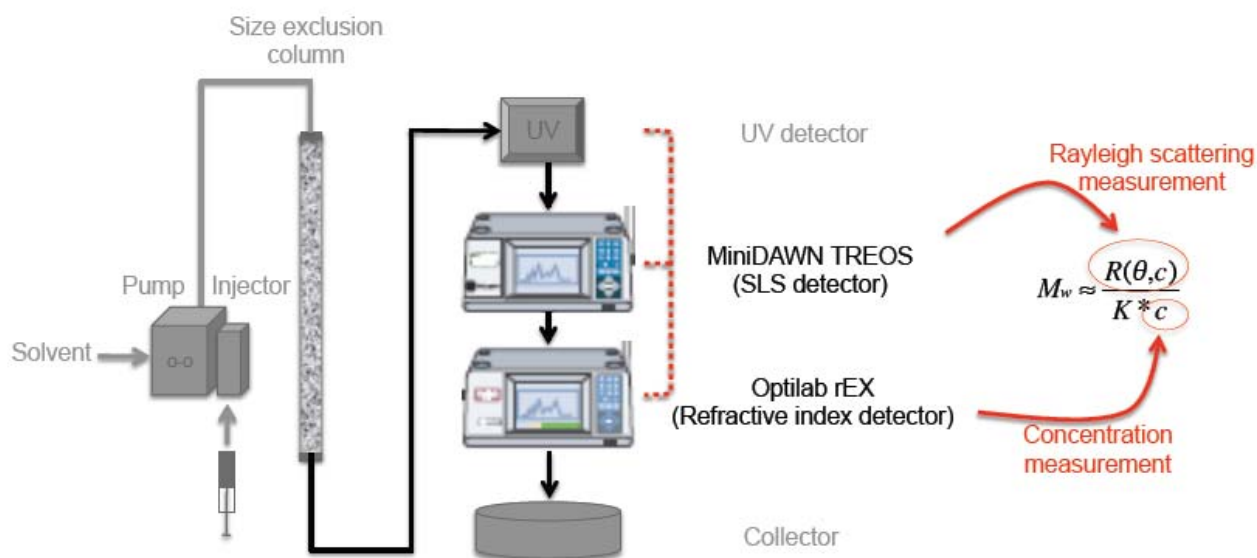


Les mesures de SAXS (Small-Angle X-ray Scattering) ont été effectuées sur la ligne SWING du Synchrotron SOLEIL. La distance entre l'échantillon et le détecteur PCCD170170 (AVIEX) était de 1.81 m. La longueur d'onde des rayons X était de 1,03 Å. Comme pour le dichroïsme circulaire, il est essentiel que la protéine soit dialysée ou ait été purifiée avec le tampon servant de référence. Les mesures ont été réalisées sur 3 échantillons de notre protéine à des concentrations différentes : 1, 2 et 4 mg/mL. Les échantillons ont été déposés dans un capillaire lui-même placé dans le passeur d'échantillon. Les dommages dus à la radiation ont été estimés par 5 expositions successives de 1 seconde espacées de 3 secondes de 5 µl de notre protéine à la plus faible concentration. Le temps de mesure a été ensuite fixé à 1 sec et un espacement de 0.5 sec parce que nous avons vu que notre protéine reste relativement stable face à la radiation (les cinq courbes de diffusion sont identiques). Nous avons réalisé les mesures sur 50 µL d'échantillons du moins concentré au plus concentré, ainsi que sur le tampon de la protéine. Environ 45 mesures ont été effectuées par échantillon, chaque mesure étant faite sur une fraction d'échantillon non encore exposée, en poussant celui-ci dans le capillaire entre chaque exposition avec un débit de 40 µL/min. Les différentes images de diffusion ont ensuite été moyennées, normalisées et corrigées de la diffusion due au tampon par le programme FOXTROT (programme développé par le groupe informatique du Synchrotron Soleil et la ligne SWING). La suite du traitement a été effectuée en utilisant la suite de programmes ATSAS développée par le groupe de Dimitri Svergun (EMBL Hambourg).

#### **D. SEC-MALLS :**

Pour déterminer la masse moléculaire exacte de nos protéines et donc déterminer leur état d'oligomérisation en solution, nous avons utilisé la technique SEC-MALLS. Il s'agit d'un système de diffusion de la lumière multi-angle (MALS) couplé à un système de chromatographie d'exclusion (SEC). La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) utilise une colonne de tamis moléculaire pour séparer les macromolécules suivant leurs tailles ou plus exactement leur volume hydrodynamique en solution. La partie détection par diffusion de la lumière multi-angles sensible aux masses molaires permet d'accéder aux variations instantanées du rayon de giration et de la masse molaire moyenne en masse MW de l'espèce éluée à chaque temps d'élution et de remonter à la distribution massique globale.

La partie de détection MALS est assurée par un système composé d'un miniDAWN TREOS (diffusion de lumière aux 3 angles 45, 90 et 135°C), d'une partie QELS et d'un système optilab T-rEX (mesure de l'indice de réfraction qui permet de remonter à la concentration en utilisant l'indice standard de réfraction des protéines) (Wyatt Technology). La colonne de tamis moléculaire est fixée sur un système HPLC (Shimadzu) avec détecteur UV (figure 23). Les échantillons à une concentration de 5 mg/mL sont centrifugés pendant 30 min à 13200 rpm, puis injectés par la machine sur une colonne de tamis moléculaire HPLC Shodex KW-803 (Phenomenex, France), qui permet de séparer les particules de masses allant jusqu'à 700 kDa. Les données sont traitées à l'aide du logiciel ASTRAV de Wyatt. Les expériences ont été réalisées sur la plateforme de Biophysique (Imagif-LEBS) par Valérie Campanacci.

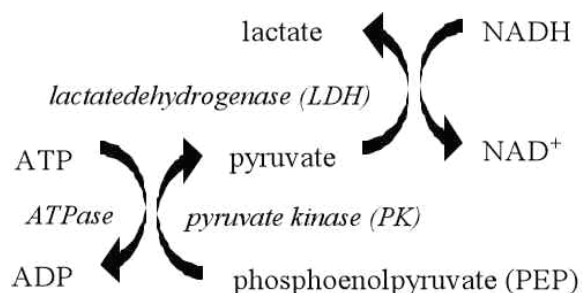


**Figure 23: Schémas descriptifs du système SEC MALLS disponible au laboratoire.** Il est composé d'une partie HPLC, D'un détecteur UV, d'un réfractomètre qui nous permet d'obtenir la concentration de notre échantillon et d'une partie diffusion de lumière à trois angles.

## IV. Mesure d'activité kinase :

### A. Réaction couplée à la PK/LDH :

Pour mesurer l'activité d'autophosphorylation du domaine kinase de FU, j'ai mis en place un test basé sur une réaction couplée à la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase (Technikova-Dobrova et al., 1991). En effet, cette technique est basée sur une réaction dans laquelle la régénération de l'ATP hydrolysé est couplée à l'oxydation du NADH (Figure 24). Après chaque cycle d'hydrolyse de l'ATP, le système de régénération composé de phosphoénolpyruvate (PEP) et la pyruvate kinase (PK) convertissent une molécule de PEP en pyruvate. Ce pyruvate est ensuite converti en lactate par la Lactate déshydrogénase (LDH) entraînant l'oxydation d'une molécule de NADH en NAD<sup>+</sup>. Cette technique permet de suivre en fonction du temps, la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm (seul ce dernier possède un pic à cette longueur d'onde) qui est proportionnelle à la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP.



**Figure 24: Principe de la réaction couplée à la LDH/PK.** L'ADP libéré après une activité ATPasique est utilisé par la PK pour transformer le PEP en pyruvate. Ce dernier sera utilisé par la LDH pour former le lactate en consommant du NADH et en libérant du NAD<sup>+</sup>.

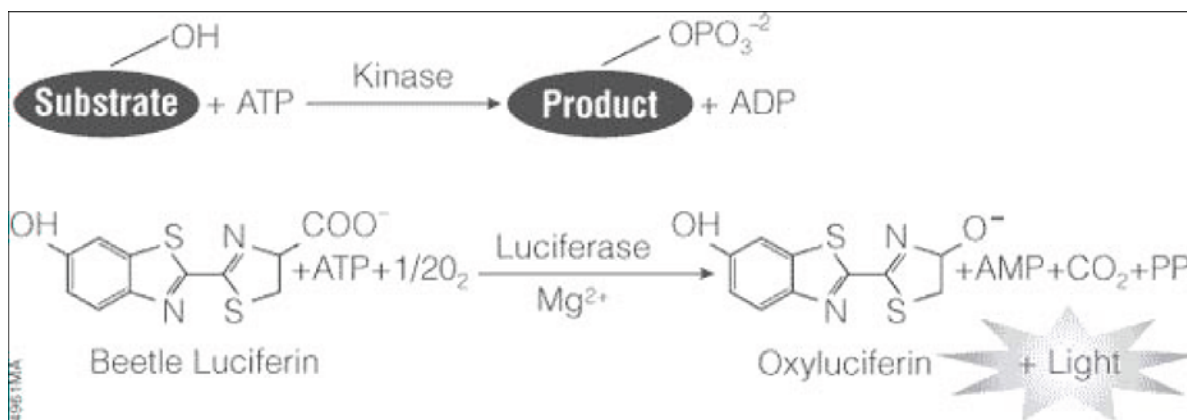
Le mélange réactionnel est préparé dans un tube Eppendorf en fonction du nombre de mesures à effectuer. Les mesures sont effectuées dans une plaque 96 puits à 22°C pendant 20 min avec un lecteur de microplaque (SpectraMax M5 de Molecular Devices) équipé du programme SOFTmax PRO (Molecular Devices).

Les concentrations des différents réactifs sont calculées pour un volume final de 100 µL. Pour cela, 480 µM de PEP, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de tampon Tris pH 7.4, 90 µM de NADH, 1U/100 µL de PK/LDH (Sigma) et 0.2- 0.5 µM de la protéine d'intérêt sont mélangés ensemble.

La réaction est ensuite déclenchée dans les puits par ajout de différentes concentrations d'ATP (0-10 mM). Les données obtenues ont permis de tracer la variation de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps. À partir de ces courbes, nous déterminons les pentes qui nous renseignent sur la vitesse de consommation de l'ATP. Nous traçons ensuite les courbes de vitesses en fonction de la concentration d'ATP qui nous donnera tous les paramètres cinétiques de la réaction : le KD, la vitesse maximale en fonction du modèle de l'hydrolyse de l'ATP (Michaelis-Menten, Coopérativité,...).

## B. Mesure en luminescence :

Il s'agit d'un test basé sur la quantification du taux d'ATP résiduel par un test couplé à la Luciférase, commercialisé dans le kit Kinase Glo (Promega Cat.N° V6711). En effet, la luminescence produite au cours de la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciféryl adénylate (Figure 25) est directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente en solution. Ainsi, en phosphorylant son substrat, la kinase va consommer de l'ATP, la mesure de la quantité d'ATP non consommé en fin de réaction nous renseigne sur les paramètres cinétiques de cette enzyme.



**Figure 25 : Principe de la réaction couplée à la luciférase.** Cette technique est basée sur la quantification de l'ATP résiduel après phosphorylation d'un substrat par sa kinase. L'ATP disponible en fin de réaction sera utilisé par la luciférase en présence de magnésium pour oxyder la luciférine en oxyluciférine et pour produire de la luminescence. La quantité d'ATP résiduel est proportionnelle à la lumière générée.

Les réactions sont réalisées dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ L et dans une plaque 96 puits. Le mélange réactionnel contient de l'ATP (0.5  $\mu$ M) ; La kinase et le substrat à la concentration voulue ; le tampon de réaction (Hepes 20 mM pH 7.4 ;  $MgCl_2$  5 mM ; albumine de sérum bovin 0.1 mg/mL) et de l'eau stérile pour compléter jusqu'à 50  $\mu$ L. Ce mélange est incubé pendant 20 min à 28°C pour permettre à la kinase de réagir, avant d'ajouter 50  $\mu$ L de réactif Kinase Glo (contenant la luciférase et la luciférine) et d'incuber pendant 10 min à température ambiante. Différents contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions, en absence d'ATP ou en absence de la protéine ou son substrat. Les mesures de luminescence des différents puits sont suivies à l'aide du lecteur de plaque (Flexstation).

## **V. Étude structurale : Tests de cristallisation**

La solubilité d'une macromolécule est fonction de nombreux paramètres tels que la concentration de la macromolécule, le pH, la force ionique et l'effet d'additifs. Lors de la cristallisation, la concentration de la macromolécule augmente jusqu'à atteindre l'état de super saturation favorable à l'obtention de cristaux, sans toutefois tomber dans la zone de précipitation. Pour étudier un grand nombre de paramètres physico-chimiques, qui peuvent influencer la cristallisation des macromolécules biologiques, nous utilisons des kits permettant de cribler un certain nombre de conditions chimiques (pH, force ionique, concentrations en précipitants...). Les criblages d'un grand nombre de conditions de cristallisation est la première étape à faire suivi d'une optimisation si les cristaux obtenus ne permettent pas d'obtenir une diffraction de bonne qualité.

La méthode que j'ai utilisé pour tous mes tests de cristallisation est la diffusion de vapeur en gouttes assises dans des plaques de 96 puits (McPherson, 1990). La goutte étant moins concentrée en agent précipitant que le réservoir, le retour à l'équilibre se fait par diffusion de vapeur de la goutte vers le réservoir, provoquant ainsi la concentration de tous les constituants de la goutte. La solution protéique est de la sorte amenée dans les conditions de sursaturation voulues.

Plusieurs tests de cristallisation ont été réalisés pour les SUFU, FU, MLF et SMO à différentes concentrations et en présence au non d'additif comme le Magnésium (10 mM), l'ATP

(10 mM) ou l'ADP (10 mM). Ces tests ont été faits avec le robot Cartésien du LEBS sur des plaques Greiner 3x96 puits. Ce robot permet la préparation des gouttes de 100 nL du réservoir et de 100, 200 et 300 nL de l'échantillon protéique. Plusieurs kits ont été utilisés : des kits factoriels comme le MB class, PEG, Classic et des kits avec échantillonnage systématique : le PEGana dont la composition a été faite au laboratoire. Les boîtes sont scannées par le robot de visualisation tous les deux jours pendant deux semaines afin de suivre l'apparition et la croissance des cristaux.

# ***RESULTATS***

## **Résultats**

### **I. Production de protéines en Cellules d'insectes :**

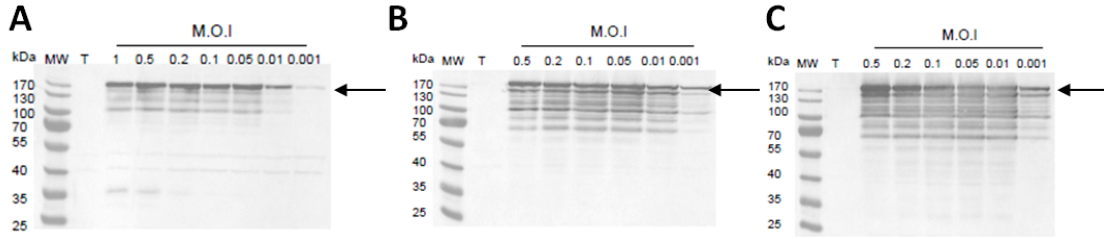
Lorsque j'ai commencé ma thèse, le laboratoire disposait de tous les outils nécessaires pour l'expression des protéines en cellules d'insectes (Sf21). Afin de mieux caractériser les différentes protéines du complexe intracellulaire de la voie HH, nous avons utilisé ce système pour produire les protéines FU et COS2 sous leurs formes entières. En effet, ce système semblait le plus adapté pour la production en grande quantité de nos protéines d'intérêt, vu que ces dernières sont des protéines de drosophile et que ce système pouvait assurer une meilleure stabilité et fonctionnalité des protéines surexprimées. De plus, les cellules d'insectes sont capables de pousser soit en plaques soit en suspension sous agitation, ce qui facilite la production à grande échelle.

#### **A. Production de la protéine Costal2 :**

##### **1. Test d'expression :**

Afin de déterminer les conditions optimales de surexpression de la protéine COS2, un test d'expression a été réalisé en variant différentes conditions de production. En effet, nous avons suivi la cinétique d'infection pour définir le temps optimal d'expression et la quantité de virus à utiliser pour avoir les meilleurs rendements. Après obtention des stocks viraux (P3), réalisés à partir de cellules transfectées avec les bacmides contenant les pFastBac12-COS2, il est nécessaire de titrer la charge virale de ces stocks, afin d'exprimer notre protéine de manière reproductible. Pour cela, nous avons calculé les titres viraux par la méthode utilisant les anticorps FastPlax pour détecter l'apparition de la glycoprotéine AcNPV gp64 à la surface de cellules infectées dès 8 à 24 heures post-infection. Les plaques (les cellules infectées) sont clairement distinguées par leur couleur bleu foncé. À partir du comptage de ces plaques, nous avons pu obtenir notre charge virale pour le stock de COS2 ( $1 \cdot 10^7$  pfu/ml) et calculer les MOI voulus (multiplicity of infection, voir Matériels et Méthodes). Le test d'expression a été réalisé par la suite dans des plaques 24 puits à 27°C en faisant varier le temps d'incubation (24, 48 et 72 heures) et le MOI entre 1 et 0.001. Ensuite chaque aliquote prélevée est analysée sur gel et par western blot avec un anticorps anti-COS2 ou un anticorps anti-Histidine.



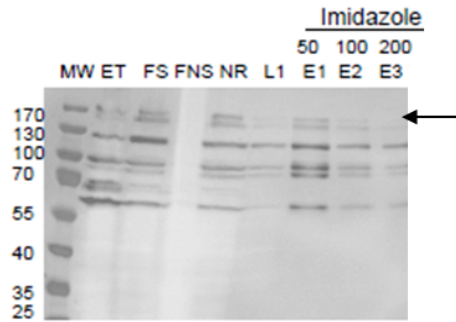


**Figure 26: Test d’expression de la protéine COS2.** Western Blot avec les anticorps anti-Costal2 (dilution 1/500; exposition 10 sec) présentant l’expression de Costal2 dans les cellules d’insectes à 27°C pendant 24 (A), 48 (B) et 72 heures (C). Les cellules ont été infectées par différents MOI afin de comparer les rendements d’expression en fonction du temps d’incubation de la concentration virale. Les cellules sont reprises dans 200 µL de bleu de charge puis déposées sur un gel 10% Acrylamide avant le transfert sur une membrane de Nitrocellulose. Les blots montrent que notre protéine commence à être surexprimée à partir de 24 heures avec les différents MOI et commence déjà à se dégrader. MW: marqueurs de poids moléculaires. T: Cellules témoins non transfectées.

Aucune bande de surexpression de COS2 n’est visible sur gel après coloration au bleu de Coomassie (non montré). Les protéines ne sont visibles que par western blot et montrent la détection d’une bande avec un poids moléculaire d’environ 170 kDa (Figure 26). La protéine commence à s’exprimer dès 24 heures après la transfection (Figure 26, A) et pour les différents MOI testés sauf pour la plus faible concentration. La quantité de protéine obtenue augmente en fonction du temps avec une meilleure expression avec 0.5 MOI après 72 heures d’incubation (Figure 26, C). Cependant, la dégradation de notre protéine, indiquée par les bandes de plus faibles poids moléculaires, augmente aussi en fonction du temps. Notre protéine devient moins stable à partir de 48 heures d’infection (Figure 26, B). En comparant avec un blot anti-histidine, nous ne voyons pas de bande après 24 heures d’incubation (non montré). Les bandes ne sont visibles qu’à partir de 48h post-infection et pour les différents MOI. Nous avons alors décidé d’exprimer notre protéine avec un MOI de 0.5 pendant 48 heures.

## 2. Expression et Purification :

Afin d’augmenter les volumes de production de notre protéine nous avons adapté les cellules à une production en suspension et sous agitation. En effet, les rendements de production de COS2 sont très faibles et pour obtenir plus de protéines nous avons augmenté les volumes de cultures à 200 mL/erlen de 1 litre dans les mêmes conditions définies dans le test d’expression. La protéine qui porte une étiquette histidine sur son extrémité N-terminale est par la suite purifiée à partir des culots de 400 mL de culture sur une colonne d’affinité au Nickel.

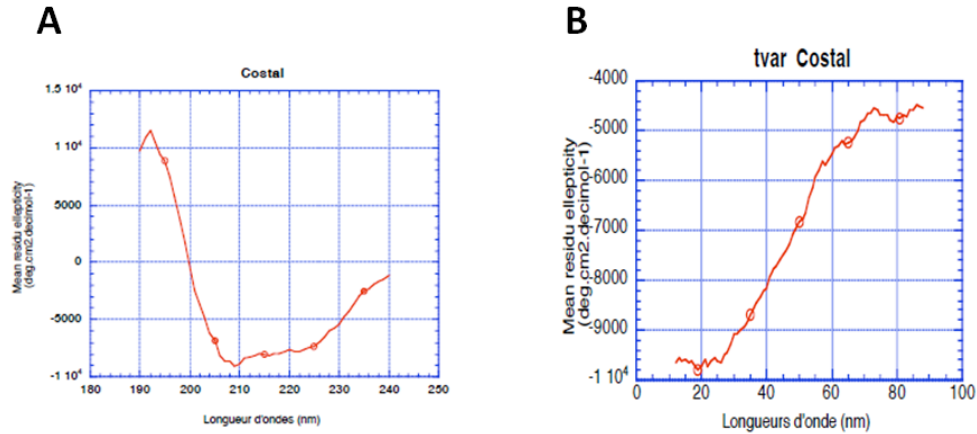


**Figure 27: Purification de la protéine COS2 produite en cellules d’insectes sur colonne de Nickel.** Western Blot avec des anticorps anti-Histidine (Dilution 1/1000; Exposition 5 min) sur les échantillons de la purification. Ce blot montre qu’une faible fraction de notre protéine est exprimée sous forme soluble et se fixe sur les billes de Nickel. La protéine n’est pas très stable, plusieurs bandes de dégradation sont visibles sur le blot. MW : Marqueurs de poids moléculaire ; ET : Extrait total ; FS : Fraction soluble ; FNS=fraction non soluble ; NR : non retenu sur la colonne de Nickel; E1-E3 : fractions d’élution de la colonne de Nickel avec 300 mM d’imidazole.

Les résultats montrent que la protéine COS2 s’exprime bien et qu’une faible partie est soluble (Figure 27). Cependant, les rendements de purification sont très faibles même en augmentant les volumes de culture. La protéine n’est visible que par western blot. Nous constatons aussi que pour chaque purification de COS2 et dans différents tampons de lyse testés, plusieurs bandes de différents poids moléculaires sont visibles. COS2 n’est pas très stable en solution et subit une dégradation avant même d’être purifiée.

### 3. Caractérisation de COS2 par Dichroïsme Circulaire :

Des analyses en Dichroïsme circulaire ont été effectuées afin de réaliser une étude structurale préliminaire de la protéine COS2 en solution qui nous permet d’obtenir des informations sur sa structure secondaire.



**Figure 28: Caractérisation de la protéine COS2 exprimée en cellules d’insecte par Dichroïsme Circulaire.** (A) Spectre de Dichroïsme circulaire : ellipticité moyenne par résidu en fonction de la longueur d’onde entre 190 et 240 nm. (B) Spectre de dénaturation en température de la protéine : ellipticité moyenne par résidu en fonction de la température entre 10 et 90°C dans le tampon phosphate pH 7.5 (50 mM) et Fluorure de sodium (50 mM) avec une concentration de la protéine de 0.1 mg/mL.

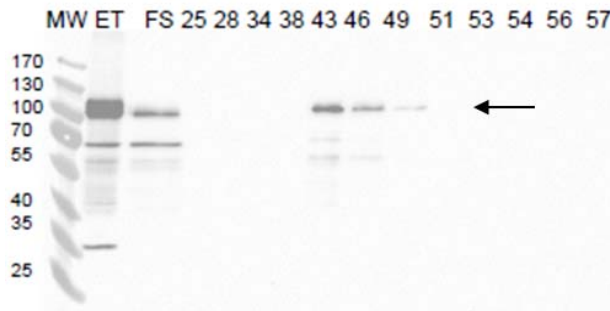
Le spectre de Dichroïsme circulaire obtenu sur le spectromètre du laboratoire pour la protéine (Figure 28, A) montre alors qu’il s’agit d’une protéine constituée d’un mélange d’hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ . L’analyse des données obtenues entre 190 et 240 nm par le programme Contin LL disponible sur le site Dichroweb montre que COS2 est constituée de 23.4 % de feuillets  $\beta$ , 25.7 % d’hélice  $\alpha$  et d’une grande partie non structuré qui constitue 30 % de la structure. Ces résultats sont comparables avec les pourcentages en structures secondaires obtenues pour différents domaines moteurs de kinésines de structures connues.

Le suivi du signal de dichroïsme circulaire à 208 nm, au cours de la dénaturation en température de la protéine COS2 entre 10 et 90°C (Figure 28, B) montre que la protéine commence à se dénaturer à partir de 30°C et qu’elle est complètement dénaturée à partir de 60°C. La protéine a une température de dénaturation de 45°C qui correspond au point d’inflexion du spectre.

En résumé, j’ai réussi à exprimer COS2 dans les cellules SF21 et à en caractériser la structure secondaire, mais les rendements de purification sont très faibles. Les quantités obtenues ne permettent pas de caractériser la protéine in vitro. Pour cela, je n’ai pas poursuivi l’expression de COS2 avec ce système.

## B. Production de la protéine FUSED :

Comme pour la protéine COS2, la titration du stock viral (P3) contenant la construction pFASTBac12- FU a été effectuée avec le même kit et nous a permis d'obtenir une charge virale de  $1 \cdot 10^7$  pfu/mL. Un test d'expression réalisé dans les mêmes conditions que COS2 nous a permis de déterminer les conditions optimales d'expression. Le meilleur rendement d'expression a été obtenu en incubant les cellules d'insectes pendant 48 heures avec un MOI de 1.2. Plusieurs purifications de FU à partir de petits volumes de culture n'ont pas permis d'obtenir un rendement de purification suffisant pour bien caractériser la protéine. Comme pour COS2, une purification a été faite à partir d'un grand volume de culture en suspension de 400 ml. Après optimisation des tampons pour améliorer la solubilité de la protéine, la lyse a été faite dans le tampon suivant : Hepes 40 mM pH 7.5, NaCl 350mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Glycérol 5% et des antiprotéases et la purification a été réalisée à 4°C sur une colonne Histrap en utilisant le système Akta.



**Figure 29: Purification de la protéine FU produite en cellules d'insectes sur colonne de Nickel (Histrap).** Western Blot avec des anticorps FU (Dilution 1/1000; Exposition 10 sec) sur les échantillons de la purification. Ce blot montre qu'une faible fraction de notre protéine est exprimée sous forme soluble et se fixe sur les billes de Nickel. MW : Marqueurs de poids moléculaire; ET : Extrait total ; FS : Fraction soluble ; 25-57 : fractions d'élution de la colonne de Nickel avec 300 mM d'imidazole.

D'après le blot, nous remarquons la présence d'une bande qui réagit aux anticorps anti-FU et qui correspond à un poids moléculaire d'environ 120 kDa (poids attendu pour la construction de FU). Notre protéine a donc été éluée dans les fractions 43 à 51 avec 300 mM Imidazole (Figure 29). Nous constatons une très faible expression de FU dans les cellules d'insectes (Sf21). Les bandes de protéines ne sont visibles ni sur gel d'acrylamide ni sur des membranes révélées

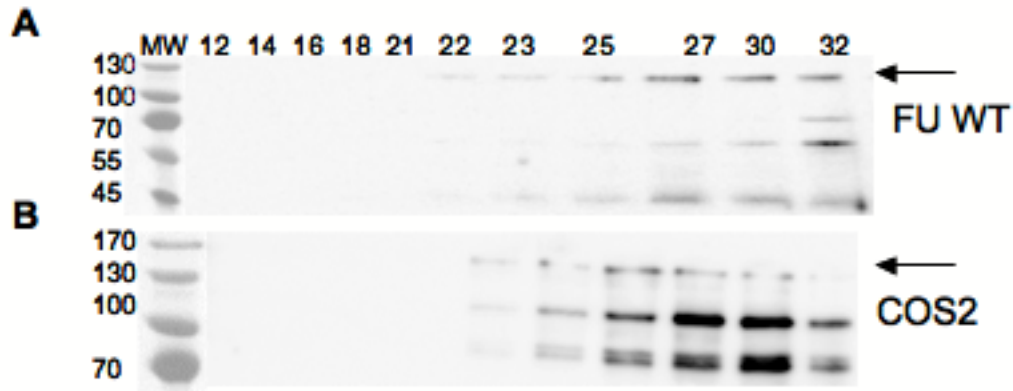
avec des anticorps anti-Histidine. On ne peut voir les bandes qu'avec l'anticorps anti FUSED qui est très spécifique de la protéine.

Afin d'améliorer les rendements de solubilité et donc de purification de notre protéine nous avons testé l'effet d'ajout d'un détergent (NP-40 à 0.1%) dans le tampon de lyse, le type de résine (Nickel, Talon, flag) et des MOI très importants (jusqu'à 13). Malheureusement aucune de ces conditions n'a permis d'avoir des rendements de purification suffisants pour pouvoir caractériser la protéine FU sous sa forme entière en solution.

### **C. Coexpression des protéines FUSED et Costal2 :**

Afin de mettre en évidence l'interaction entre les protéines FU et COS2 et de purifier le complexe pour une caractérisation en solution et pour les tests de cristallisation, nous avons co-exprimé les deux protéines dans les cellules d'insectes en co-transfectant avec les stocks viraux de chaque construction en même temps : COS2 avec une étiquette histidine et FU entier avec une étiquette flag. Les cultures ont été faites à 27°C en suspension dans 200 mL/erlen pendant 48 heures et en transfectant avec des MOI de 2.5 pour chaque construction. La purification a été réalisée sur un culot de 200 mL de culture en deux étapes : une colonne d'affinité sur la résine Talon et un tamis moléculaire (Superose 6 10/300). Après élution des protéines, les différentes aliquotes sont analysées sur gel par western blot en révélant les membranes avec les anticorps spécifiques pour chaque protéine séparément.

Comme pour les protéines seules, nous n'avons pas pu voir de bandes sur gel après coloration au bleu de Coomassie. Après la première étape de purification, les bandes ne sont visibles que par western blot avec les anticorps de chaque construction (non montré) qui montre que les deux protéines sont bien co-exprimées et qu'elles sont co-éluées de la résine de Nickel dans les mêmes fractions. En effet, la protéine FU ne possède pas d'étiquette histidine, elle est retenue sur la colonne par la protéine COS2. Nous constatons aussi que la protéine FU est moins stable que lorsqu'elle est exprimée seule, comme le montre l'augmentation des bandes de dégradation observées sur blot mais la forme longue de FU est toujours majoritaire malgré l'apparition cette dégradation.



**Figure 30: Coexpression COS2 et FU dans les cellules d'insectes.** Western Blots présentant le profil d'élution d'une colonne de tamis moléculaire (Superose 6 10/300). La révélation des blots a été effectuée avec des anticorps spécifiques de chaque protéine séparément. (A) Analyse des fractions avec un anticorps anti-FU (Dilution 1/1000; Exposition 30 sec). (B) Analyse des fractions d'élution avec un anticorps Anti COS2 (Dilution: 1/5000; Exposition 20 sec). MW : Marqueurs de poids moléculaire ; 12-37 : fractions d'élution de la colonne.

Après dépôt sur colonne de tamis moléculaire des fractions d'élution concentrées, nous constatons que les deux protéines sont co-éluées dans les mêmes fractions (22 à 32) comme le montrent les deux blots avec les anticorps spécifiques (Figure 30, A et B). En effet, les deux protéines sont obtenues dans les mêmes fractions avec un volume d'élution de 14 mL correspondant une masse moléculaire apparente d'environ 400 kDa. Nous constatons aussi que COS2 n'est pas très stable et qu'elle est sujette à la dégradation. Une forme tronquée de COS2 qui fait environ 100 kDa s'accumule dans les fractions 27-32 est semble être très stable (Figure 30, B).

Ces résultats montrent que nous avons réussi à co-exprimer les deux protéines et nous avons pu montrer que ces deux protéines sont capables d'interagir ensemble et de se co-éluer dans un complexe qui fait environ 400 kDa, confirmant ainsi les publications rapportant des interactions en cellules et en double hybride (Monnier et al., 2002) (Ruel et al., 2007). Cependant, les quantités de complexe obtenues sont insuffisantes pour réaliser des caractérisations en solution.

Je me suis donc tournée vers le système bactérien pour exprimer mes protéines. La suite de ce manuscrit détaillera les résultats obtenus.

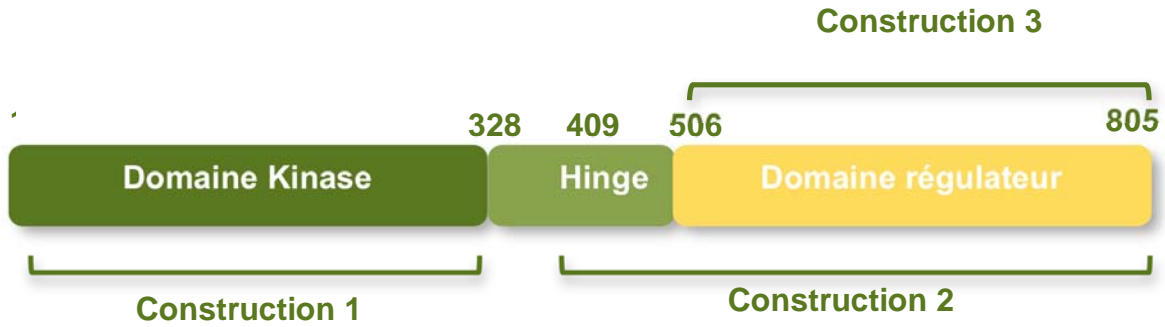
## II. Production en Bactéries :

### A. Caractérisation de la protéine FUSED :

#### 1. Expression-Purification de FUSED sauvage :

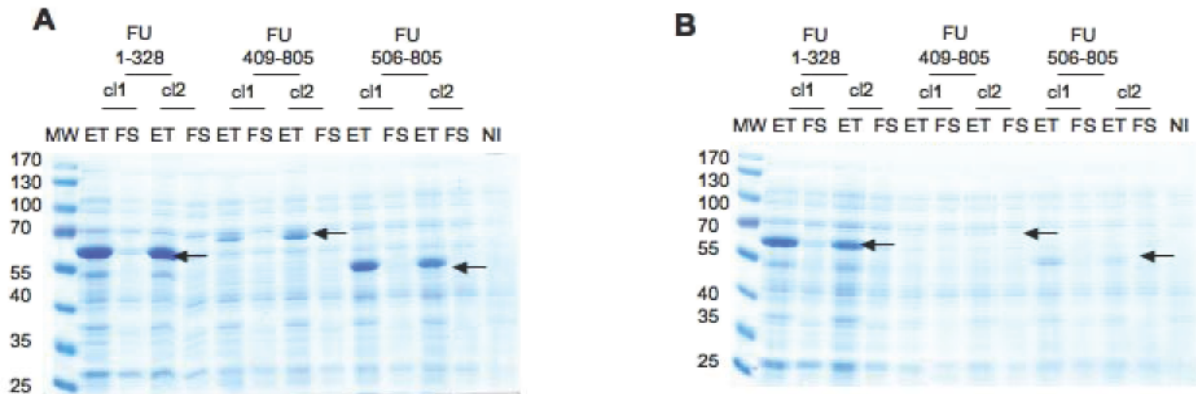
##### a. Expression :

La protéine FUSED est l'une des protéines-clés pour la régulation de la voie HH. Il s'agit d'une sérine /thréonine kinase dont SUFU et Costal2 sont des substrats. Cette protéine est constituée de deux domaines : un domaine kinase (partie N-terminale) qui constitue le domaine catalytique de la protéine et un domaine régulateur (partie C-terminale) qui interagit avec le domaine kinase et joue un rôle très important dans la régulation de l'activité de FU. Les deux domaines sont séparés par une région d'environ 200 acides aminés (figure 15 dans l'introduction). Je me suis intéressée à la caractérisation de la protéine FU en solution. Ainsi, la protéine sous sa forme entière et différents domaines ont été clonés dans différents vecteurs d'expression bactériens (Figure 31). En effet, en se basant sur un alignement de séquences avec d'autres kinases connues nous avons pu définir les différents domaines qui nous permettront de caractériser l'activité de la protéine en solution. Pour cela j'ai cloné les trois constructions suivantes : Construction1 : Domaine catalytique (aa 1-328), Construction2 : Domaine charnière + Régulateur (aa 409-805), Construction3 : Domaine régulateur (aa 506-805) et la protéine entière ont été clonées dans les vecteurs: pGEX-CS-FA pour obtenir des protéines en fusion avec GST en N-terminal ou pET-HT-TEV pour obtenir une protéine avec une étiquette 6-Histidine en N-terminal et un site de coupure à la TEV.



**Figure 31: Différentes constructions de la protéine FU clonées et exprimées en bactéries.** Trois constructions: Construction1 : Domaine catalytique (aa 1-328), Construction2 : Domaine charnière + Régulateur (aa 409-805), Construction3 : Domaine régulateur (aa 506-805) ainsi que la protéine entière ont été clonées dans différents vecteurs.

Après l’obtention des clones positifs, un test d’expression a été réalisé (Figure 32) afin de déterminer les conditions optimales d’expression et de solubilité des différentes constructions. Pour cela plusieurs souches d’expression ont été testées ainsi que différentes températures d’induction.



**Figure 32: Tests d’expression des différentes Constructions de FU à deux températures d’induction différentes 37°C et 20°C.** Gel d’acrylamide 12% montrant les différentes bandes obtenues après analyse des fractions totales et solubles deux clones différents pour les constructions FU (aa1-aa328), FU (aa409-aa805) et FU (aa506-aa805) en fusion avec la GST. (A) L’expression est induite avec 0.5 mM d’IPTG à 37°C pendant 4 heures. (B) culture à 20°C sur la nuit après une induction avec 0.5 mM d’IPTG.

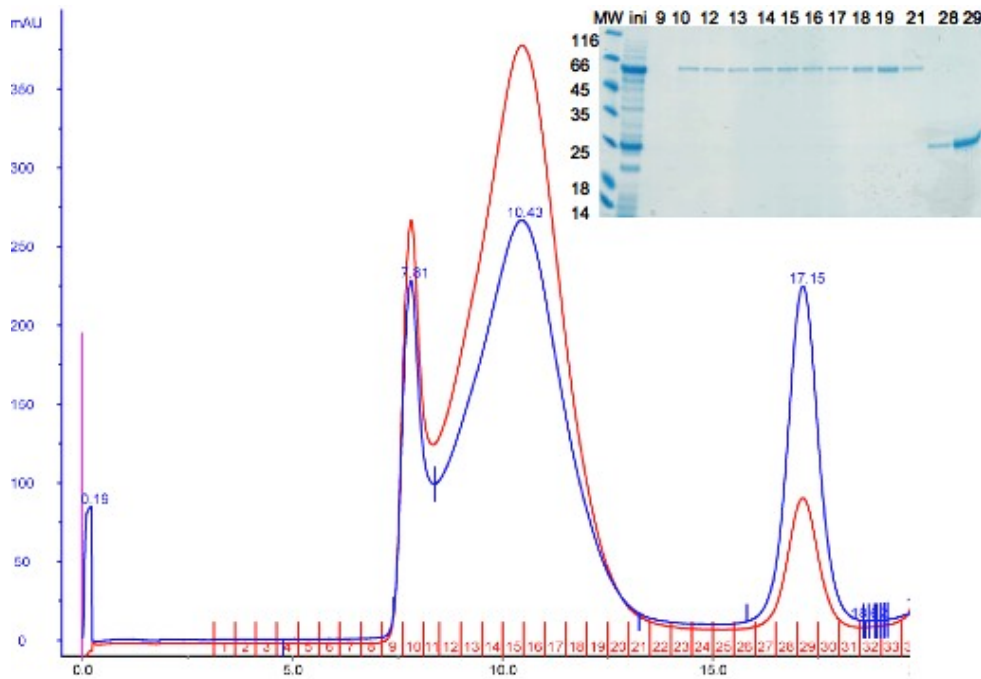
Malheureusement, la protéine FU sous sa forme entière avec une étiquette 6-histidine ou en fusion avec la GST, ne s’exprime pas. Concernant les domaines exprimés seuls, la figure 32 montre que seul le domaine kinase s’exprime bien en fusion avec la GST ou avec une étiquette 6-histidines (non montré). Cependant, le rendement d’expression et de solubilité sont plus



importants avec la GST (Figure 32, A). La suite de la caractérisation a été réalisée avec le domaine kinase en fusion à la GST exprimé dans les souches *Rosetta pLysS* et cultivées pendant 18 heures à 20°C après une induction avec 0.2 mM IPTG.

**b. Purification du domaine kinase :**

Le domaine kinase de la protéine FU exprimé en fusion avec la GST est purifié à partir des culots de 8 litres de culture dans le tampon (Hepes pH 7.5 50 mM, NaCl 400 mM, Glycérol 5%, DTT 1 mM). La purification est réalisée en deux étapes, une première étape d'affinité sur des billes de Glutathion suivie d'une deuxième étape sur une colonne de tamis moléculaire. Assez récemment, nous avons constaté que le domaine kinase de FU est co-exprimé avec les chaperonnes GroEL et GroES, probablement parce qu'elle n'est pas très stable et que la bactérie tente de la replier. Nous avons alors optimisé le protocole de purification pour éviter la contamination de notre protéine avec la chaperonne GroEL qui semble avoir une bonne affinité pour les billes de Glutathion. Pour cela, nous effectuons une compétition avec d'autres substrats potentiels de la chaperonne. Avant de déposer le surnageant sur les billes pour la première étape de purification, ce dernier est incubé avec 10 mM d'ATP et des extraits de bactéries dénaturés avec 8 M d'urée pour inciter GroEL à replier ces protéines et se détacher de FU et des billes.



**Figure 33 : Purification de FUSED kinase (GST-Fu 1-328)- Profil d'éluion après un tamis moléculaire sur une colonne Superose 6 et analyse des différentes fractions sur Gel de polyacrylamide.** L'éluion de la protéine est suivie sur le chromatogramme à 280 nm (en bleu) et à 260 nm (en rouge). Le chromatogramme montre que notre protéine migre comme une grosse particule en solution et s'éluie dans les premières fractions de la colonne presque dans le volume mort (7.7 mL). FU seule (fractions 9-11) et en complexe avec GroEL (12-21) sont séparées sur la colonne. Les fractions obtenues sont analysées sur gel acrylamide 12% : MW : Marqueurs de poids moléculaire ; Inj : échantillon de protéine injectée sur la colonne ; 9-29 : fractions d'éluion de la colonne. Le gel montre que la protéine a un poids moléculaire correspondant à celui attendu (63 kDa).

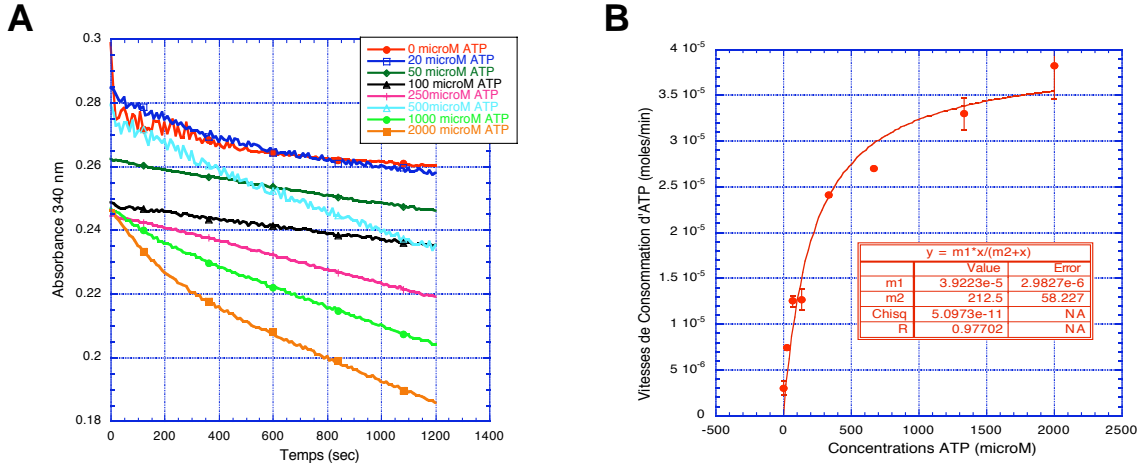
Les résultats obtenus (Figure 33) montrent qu'une faible bande du domaine kinase est visible sur gel coloré au bleu de coomassie. De plus la protéine est assez instable, ceci se traduit par la bande de dégradation de la GST (fractions 28-29) et par l'interaction avec GroEL pendant toutes les étapes de purification. Le chromatogramme montre que nous sommes capable de séparer la fraction de FU seule qui s'éluie dans les fractions de plus hauts poids moléculaire (fractions 9-11 sur la figure 33) de celle en complexe avec GroEL (fractions 12-21). Ceci est visible sur gel d'acrylamide qui montre une seule bande pour le premier pic d'éluion de la colonne qui correspond à la protéine FU et deux bandes très proches dans le deuxième pic d'éluion qui correspond au complexe FU-GroEL. Un contrôle en spectrométrie de masse sur la plateforme SICAPS (Imagif) nous a permis de vérifier que GroEL n'est pas présent dans le premier pic. Les rendements de purification sont très faibles, mais les quantités de protéines pures obtenues nous ont permis de caractériser FU en solution, et de la comparer aux mutants.

## **2. Expression- Purification des mutants :**

De nombreux mutants de FU ont été décrits comme ayant une influence sur la voie HH du fait de leur perte d'activité kinase (Aikin et al., 2008) (voir Discussion). Afin de comparer l'activité du domaine kinase que j'ai réussi à produire par rapport aux activités des mutants déjà décrits dans la littérature, nous avons décidé de cloner et de purifier deux mutants décrits comme mutants ayant perdu l'activité de FUSED dans les cellules. Pour cela, j'ai utilisé le kit "QuikChange II Site-Directed Mutagenesis" (Agilent) pour obtenir les deux mutants suivants : le simple mutant FU S159A et le double mutant T158A/S159A (voir partie Matériels et Méthodes). Ces deux mutants ont été exprimés et purifiés dans les mêmes conditions que la protéine sauvage. Les résultats obtenus montrent que les deux mutants s'expriment dans les mêmes conditions que la protéine sauvage. En effet, les deux mutants sont aussi coexprimés avec GroEL et montrent les mêmes problèmes de purification et le même profil d'élution sur tamis moléculaire. Nous avons alors utilisé le même protocole de purification que la protéine sauvage pour obtenir les protéines pures. Les rendements de purification sont très faibles.

## **3. Caractérisation de l'autophosphorylation de FUSED :**

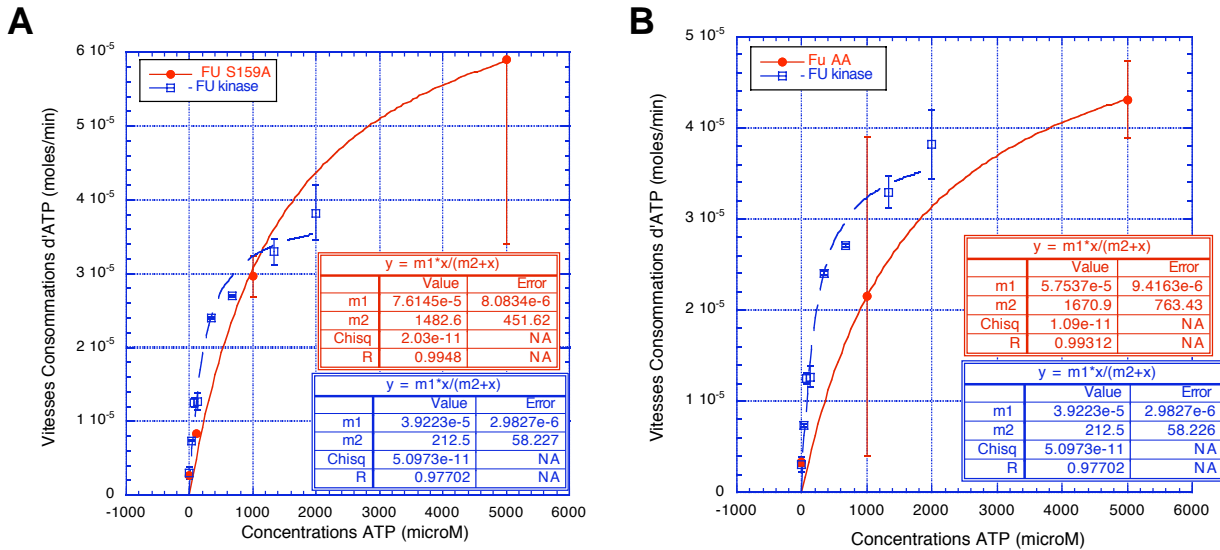
Des études ont montré que FU est activée via une autophosphorylation sur différents résidus et particulièrement sur le résidu Sérine 159 (Fukumoto et al., 2001) (Zhou and Kalderon, 2011). Afin de mettre en évidence cette activité, j'ai mis en place un test basé sur une réaction couplée à la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase qui permet de suivre en fonction du temps, la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm qui est proportionnelle à la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP (voir partie Matériels et Méthodes). La consommation de l'ATP est suivie en fonction du temps (Figure 34, A). La pente de ces droites correspond à la vitesse d'hydrolyse de l'ATP. Ces vitesses nous ont permis de tracer la variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration d'ATP comme le montre la figure 34 :



**Figure 34: Mise en évidence de l'autophosphorylation du domaine kinase de FU (sauvage) (GST-FU-1-328).** (A) Courbes de variation de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps à des concentrations variables d'ATP et à une concentration fixe de FU (0.3  $\mu$ M). (B) Les pentes de ces différentes courbes sont déterminées par ajustement linéaire puis utilisées pour tracer la courbe de la Vitesse en fonction de la concentration d'ATP. Cette courbe nous a permis de montrer que FU s'autophosphoryle *in vitro* et cette phosphorylation suit le modèle de Michaelis-Menten. Le paramètre m1 représente la vitesse maximale, et m2 la constante de Michaelis (en  $\mu$ M). Une constante d'affinité pour l'ATP de l'ordre de 212  $\mu$ M a pu être déterminée.

Les courbes montrent une diminution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps qui devient linéaire après un temps de démarrage, traduisant une augmentation de l'hydrolyse d'ATP. Cette hydrolyse est proportionnelle à la concentration d'ATP à une concentration fixe de la kinase FU (0.3  $\mu$ M) (Figure 34, B). À partir de la courbe représentant la vitesse en fonction de la concentration d'ATP, nous constatons que l'autophosphorylation de FU suit le modèle de Michaelis-Menten : la kinase a une affinité de l'ordre de 212  $\mu$ M pour l'ATP avec une vitesse maximale d'hydrolyse de  $3.92 \cdot 10^{-5}$  moles ATP/min.

Afin de vérifier si les mutants cités dans la littérature comme inhibant l'activité de FU sont capables de s'autophosphoryler en solution, nous avons réalisé le même test avec les mutants S159A et T158A/S159A (Figure 35) purifiés dans les mêmes conditions que la protéine sauvage.



**Figure 35: Comparaison de l'autophosphorylation du domaine kinase de FU (GST-FU-1-328) et des mutants FU S159A et FU AA (T158A/S159A).** Courbes de variation de la vitesse en fonction de la concentration d'ATP et ajustement des paramètres de Michaelis-Menten. Le paramètre m1 représente la vitesse maximale, et m2 la constante de Michaelis (en  $\mu\text{M}$ ) (A) pour le simple mutant et le sauvage (B) double mutant et sauvage. Les deux mutants continuent de s'autophosphoryler mais avec une plus faible affinité pour l'ATP que la protéine sauvage.

Les résultats obtenus montrent que les deux mutants continuent à s'autophosphoryler en solution mais montrent une faible affinité pour l'ATP. En effet, les deux ont une affinité de l'ordre de 1.5 mM pour l'ATP (Figure 35, A) ce qui représente un facteur 7 par rapport à la protéine sauvage. De plus, ces deux protéines n'arrivent pas à saturation même avec 5 mM d'ATP. Il faut donc augmenter considérablement la concentration en substrat pour atteindre la vitesse d'hydrolyse de la protéine sauvage.

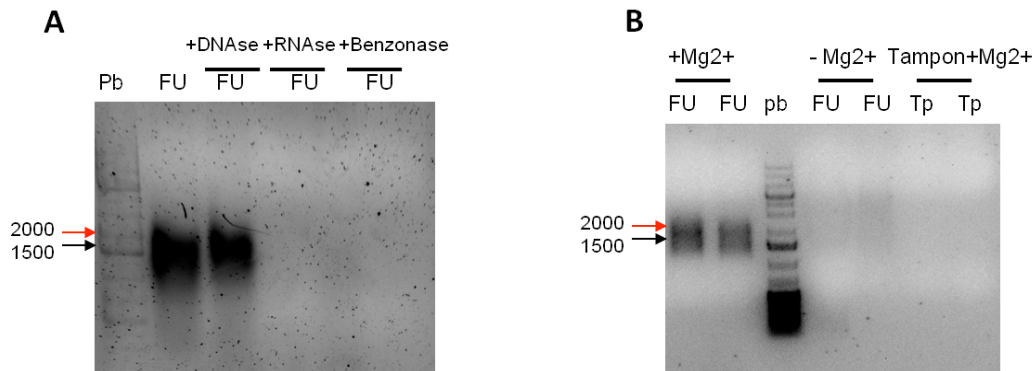
Les deux mutants sont beaucoup plus instables que la protéine sauvage et plus particulièrement le double mutant, ceci se traduit par l'augmentation des barres d'erreur en fonction de la concentration (Figure 35, B). Ces résultats montrent que ces mutants sont toujours capables de consommer de l'ATP en solution. Cependant ces mutations diminuent clairement l'affinité pour l'ATP probablement en déstabilisant la protéine en solution. Ce changement dans l'affinité n'altère pas considérablement l'activité des mutants de FU en solution : on ne peut pas parler de "kinase dead". Toutefois, cette diminution de l'affinité des mutants pour l'ATP peut être

suffisante dans la cellule pour perturber l'activité d'autophosphorylation de FU et donc le rôle joué par cette protéine dans l'activation de la voie Hedgehog.

#### 4. FUSED fixe l'ARN :

##### a. Mise en évidence de la présence d'un Acide nucléique :

En purifiant le domaine kinase, nous nous sommes rendu compte que, dans certaines conditions de purification, l'absorbance à 260 nm (absorbance des acides nucléiques) était plus élevée que celle à 280 nm (absorbance des résidus aromatiques des protéines). Pour analyser la présence d'acide nucléique avec FU, nous avons déposé un échantillon de protéine purifiée sur un gel d'agarose 1%. Comme le montre la figure 36 A, FU est copurifiée avec un acide nucléique visible par deux bandes sur gel, une bande qui migre au même niveau que la bande du marqueur à 1500 pb et une bande au même niveau que la bande à 2000 pb du marqueur. Afin de vérifier si cet acide nucléique était de l'ADN ou de l'ARN, nous avons procédé à une digestion par des enzymes capables de digérer spécifiquement l'ARN (RNase I), l'ADN (DNase I) ou les deux (Benzonase).

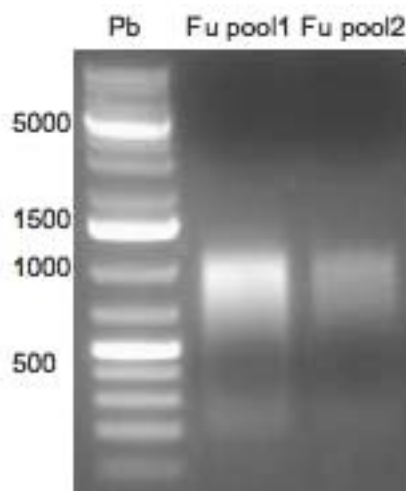


**Figure 36: GST- FUSED (1-328) fixe de l'ARN en présence de Mg<sup>2+</sup>.** (A) Gel d'agarose 1% révélé après dépôt de 10 µL de FU kinase purifiée non traitée et traitée avec la DNase I, la RNase I et la benzonase. (B) Gel d'agarose 1% montrant des échantillons de FU kinase purifiée dans un tampon ±Mg<sup>2+</sup>.

Le gel d'agarose montre que les bandes présentes dans l'échantillon de FU disparaissent après digestion du même échantillon avec la RNase I et la Benzonase et pas avec la DNase I. Ceci

montre qu'il s'agit probablement de deux séquences d'ARN de deux tailles différentes puisque les deux bandes disparaissent après digestion. Nous avons alors voulu déterminer dans quelles conditions ces fragments d'ARN sont purifiés avec FU. Pour cela, nous avons testé plusieurs tampons avec et sans magnésium, puisque le magnésium est connu pour favoriser la fixation des nucléotides. La figure 36 B montre que pour le même tampon de purification, l'ARN n'est copurifié avec FU qu'en présence de magnésium dans le tampon de purification. En effet, le magnésium améliore l'affinité de FU pour l'ARN qui reste fixé pendant toutes les étapes de la purification.

Après optimisation des conditions de purification de FU et l'élimination de la contamination avec les chaperonnes, nous avons pu confirmer que l'ARN se fixe bien sur FU et non pas sur GroEL.



**Figure 37: FUSED (GST-FU-1-328) (et non GroEL) est responsable de la fixation de l'ARN.** Gel d'agarose 1% révélé après dépôt de 10  $\mu$ L de FU kinase purifiée après une superose 6. Les deux échantillons correspondent au premier (pool 1) et au deuxième (pool 2) pic d'éluat de la colonne.

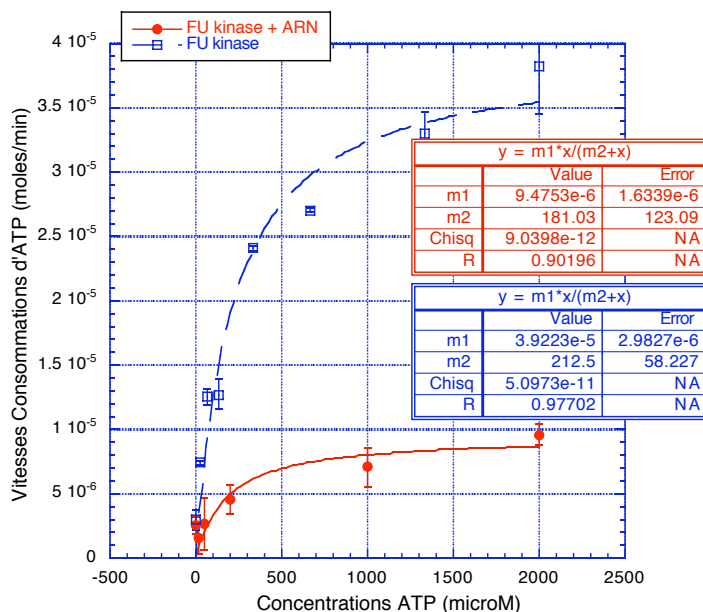
Le gel montre (Figure 37) qu'une grande quantité d'ARN est présente dans le premier pic de la colonne superose 6 (pool 1) correspondant à l'éluat de FU seule (voir partie Purification de FU). Le deuxième pic correspond à l'éluat du complexe GroEL-FU (pool 2) d'où la présence d'une faible bande sur gel. Ce gel montre bien que c'est le domaine kinase de FU qui fixe l'ARN.

**b. Identification de l'ARN :**

L'ARN a été isolé à partir d'un échantillon de FU kinase purifié par extraction au phénol/chloroforme/isoamyl alcohol. Les séquences d'ARN ainsi récupérées ont été envoyées à séquencer chez FASTERIS (une compagnie Suisse). Les résultats obtenus confirment qu'il s'agit de séquence d'ARN et plus précisément d'ARN ribosomaux. En effet, quatre séquences ont pu être identifiées correspondant à l'ARN 16S et l'ARN 23S du ribosome de *E. coli* : la première séquence correspond à la séquence exacte de l'ARN 16S au niveau des bases 100 jusqu'à 456. Les trois autres séquences s'alignent bien avec l'ARN 23S au niveau des régions 1153-1482, 1741-2085 et 2475-2874. Ces résultats montrent que le domaine kinase de FU a une affinité pour l'ARN ribosomal de bactérie.

**c. Effet de la fixation de l'ARN sur l'activité d'hydrolyse d'ATP de FU :**

Nous avons ensuite voulu vérifier l'effet de la fixation de cet ARN sur l'activité d'autophosphorylation de FU (Figure 38). Pour cela, nous avons comparé l'activité de FU purifié dans le même tampon mais en présence ou en absence de Magnésium. La mesure d'activité a été réalisée par le même test de réaction couplée en suivant l'absorbance du NADH à 340 nm.



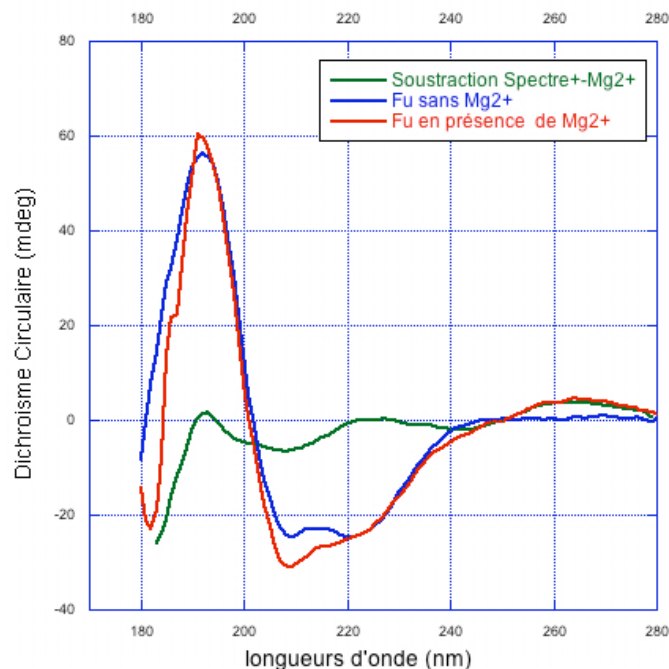
**Figure 38: Courbes de variation de la vitesse en fonction de la concentration d'ATP pour la protéine FU copurifiée ou non avec l'ARN.** La courbe montre que l'autophosphorylation de GST-FU-1-328 est très diminuée en présence d'ARN.



Les courbes montrent que l'activité de consommation de l'ATP par FU est très diminuée en présence d'ARN par rapport à la protéine purifiée sans ARN. La constante d'affinité calculée montre une erreur très importante (voir tableau des valeurs calculées Figure 38), cependant cette valeur suggère que l'affinité pour l'ATP est du même ordre de grandeur avec et sans ARN. En revanche, la vitesse d'hydrolyse de l'ATP est diminuée d'environ 4 fois par rapport à la protéine purifiée sans ARN. Donc la fixation de l'ARN sur FU ralentit son activité d'hydrolyse de l'ATP suggérant une diminution de son autophosphorylation. Cependant, il est important de refaire la mesure après traitement de l'échantillon avec la RNase afin de confirmer que cet effet est dû à la fixation de l'ARN sur FU.

**d. Analyse en dichroïsme circulaire sur FU avec et sans ARN :**

Afin de mieux caractériser la présence de l'ARN en complexe avec la protéine FU, nous avons réalisé des mesures de Dichroïsme circulaire sur la ligne de lumière DISCO au Synchrotron Soleil. Ces mesures nous ont permis de faire des spectres sur des longueurs d'ondes allant de 170 nm à 320 nm. Les mesures ont été faites avec la protéine FU purifiée en présence ou en absence de Magnésium dans le tampon de purification (tris 50 mM, NaCl 300 mM,  $\pm$  MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glycérol 10%, DTT 2 mM). En effet, comme nous l'avons déjà montré, le magnésium favorise la fixation de l'ARN sur la protéine. Les mesures ont été faites avec la protéine concentrée à 1 mg/ml dans une cellule en fluorure de calcium avec un trajet optique de 21 microns. Les courbes suivantes (Figure 39) montrent une comparaison des spectres obtenus en présence ou en absence de magnésium dans le tampon de purification.



**Figure 39: Spectres de Dichroïsme Circulaire de la protéine FU domaine kinase (1-328) en fusion à la GST obtenus sur la ligne DISCO du Synchrotron SOLEIL.** Comparaison entre les spectres CD obtenus en présence et en absence d'ARN. Le spectre de différence obtenu après soustraction des spectres CD  $\pm$  ARN est représenté en vert.

En effet, le spectre obtenu pour la protéine sans magnésium montre un minimum à 208 nm et un autre à 222 nm alors que le spectre obtenu en présence de magnésium montre un maximum à 260 nm et un minimum plus important à 208 nm. La soustraction des deux spectres nous donne un spectre CD ressemblant à celui d'un acide nucléique avec un maximum à 260 nm, caractéristique d'une séquence d'ARN (en vert Figure 39). Ces mesures confirment la présence d'ARN copurifié avec FU en présence de magnésium.

Des mesures de CD pour étudier la dénaturation en température de FU en présence ou en absence d'ARN seront réalisées afin d'étudier l'influence de cette fixation sur la conformation de la protéine et sur sa stabilité.

## **B. Caractérisation de la protéine SUFU :**

### **1. Expression et caractérisation Biophysique :**

#### **a. Résumé de l'article :**

Suppresseur de FU (SUFU) est un régulateur négatif de la voie de signalisation HH (Kogerman et al., 1999) (Cooper et al., 2005) (Svard et al., 2006). Le gène *sufu* a été identifié au cours d'un crible de gènes qui compensent la perte de *fu* chez la drosophile (Preat, 1992). Le rôle de SUFU est apparemment marginal chez la drosophile et absolument indispensable à la régulation de cette voie chez les mammifères. Chez la drosophile, le gène *sufu* code pour une protéine de 468 acides aminés qui ne montre pas d'homologie avec des familles de protéines connues. Des études biochimiques ont montré, que dans les extraits d'embryon ou des cellules du disque imaginal de l'aile, la protéine SUFU existe dans deux complexes protéiques distincts et avec des affinités différentes. Le premier est le complexe HTC où SUFU se retrouve en interaction avec les protéines FU, COS2 et les microtubules. Le deuxième est un autre complexe cytoplasmique formé par les protéines SUFU et CI (Ogden et al., 2004). Ces études ont montré que SUFU est faiblement associée au premier complexe. Cependant son interaction avec CI semble être plus importante et a été démontrée par des essais d'immunoprécipitation et de double hybride. Ces essais ont montré une interaction directe de SUFU avec FU et CI suggérant que ces deux protéines sont responsables du recrutement de SUFU dans chacun des deux complexes identifiés (Monnier et al., 1998). Par la suite une cartographie des interactions de SUFU avec ses partenaires a été établie et montre que la région 306-436 de FU est suffisante pour l'interaction ainsi que la région 212-268 de CI (Monnier et al., 1998) (Methot and Basler, 2000). Ces interactions nous renseignent sur le rôle de SUFU dans la régulation de la voie HH. En effet, le CI sous sa forme activatrice (CI-155) est une protéine labile qui est stabilisée par son interaction avec SUFU. La phosphorylation de SUFU par FU suite à une activation de la voie HH entraîne la dissociation du complexe CI-SUFU et la migration de CI-155 dans le noyau (Ohlmeyer and Kalderon, 1998). La voie HH est très conservée sur le plan moléculaire et mécanistique chez la drosophile et chez les mammifères. Comme son homologue chez la drosophile, la protéine SUFU humaine ne montre pas de séquences caractéristiques à part une région consensus de phosphorylation par la PKA en position 128, 243, 301 et 346, respectivement. Un fragment de la protéine SUFU humaine correspondant aux acides aminés 27-268 a été cristallisé (Merchant et

al., 2004). Cette région partage une identité de séquence de 47% avec la protéine de drosophile. L'analyse de cette structure a révélé la présence d'une surface concave très riche en acides aminés acides (E106, D111, E152, D159, E181, E221 et D262) et comme cette partie cristallisée contient la région d'interaction avec la protéine GLI1, ce motif acide peut constituer une surface fonctionnelle impliquée dans la régulation de la fonction de SUFU. Ces quelques études réalisées sur la protéine SUFU humaine constituent les seules données structurales et fonctionnelles disponibles sur la protéine SUFU. Dans ce travail, nous présentons une caractérisation structurale en solution de la protéine SUFU de drosophile qui nous a permis d'identifier de nouveaux motifs conservés qui semblent très importants dans la fonction de SUFU et les interactions protéine-protéine avec ses partenaires.

***Résultats :***

- Dichroïsme Circulaire :

Nous avons réussi à exprimer la protéine SUFU sous sa forme entière dans les bactéries et à la purifier grâce à une étiquette 6-Histidines en N-terminale. Afin d'étudier la stabilité de la protéine SUFU en solution, nous avons réalisé des expériences de Dichroïsme Circulaire (CD) sur la ligne DISCO du Synchrotron Soleil. Pour cela, nous avons utilisé notre protéine initialement purifiée dans le tampon (Tris-HCl 20mM pH 8.5, NaCl 150 mM,  $\beta$ -mercapto 2 mM) à une concentration de 4.1 mg/ml et nous avons comparé la stabilité de SUFU dans son tampon de purification et dans les différents tampons suivants : Hepes 20 mM pH 7.5, KF 100 mM et Phosphate 20 mM pH 6, KF 100 mM. Les résultats obtenus montrent que SUFU est un peu plus stable dans le tampon Hepes pH 7.5 et contient une structure secondaire composée de 20% d'hélice  $\alpha$  et 21% de feuillets  $\beta$ . L'analyse des données de dénaturation en température, entre 15 et 90°C, avec le programme Best Sel a montré que la dénaturation de SUFU s'accompagne de la perte des structures en hélices et d'une augmentation des structures en feuillet avec une température de 40°C et une énergie de dénaturation de 40 kcal/mol respectivement. Ces résultats montrent que SUFU est un peu plus structurée en tampon Hepes pH 7.5 et qu'une partie et non structurée en solution. Afin d'obtenir des informations structurales sur le domaine C-terminal de SUFU nous avons soustrait le contenu en structure secondaire du domaine N-terminal cristallisé de celui de la protéine entière. Cette soustraction nous a permis d'estimer la composition en structure secondaire du domaine C-terminal : 15 % d'hélice  $\alpha$  ; 24% de feuillets  $\beta$  et 36% de désordre. Ces résultats montrent que le domaine C-terminal est aussi composé d'un mélange d'hélice et de feuillet et une prédiction de structures secondaires avec le serveur Prof suggère que

seuls 130 acides aminés de ce domaine sont bien repliés et que les 80 acides aminés intermédiaires ne sont pas structurés.

- Diffusion de lumière en solution :

Nous avons pu montrer aussi d'une part, par des analyses en diffusion de lumières multi angles, que SUFU est monomérique en solution avec une masse moléculaire calculé de 56.7 kDa correspondant à la masse théorique et avec un rayon d'hydratation de 31 Å. Ces résultats révèlent que SUFU a une forme allongée en solution. D'autre part, des mesures de SAXS (Small-angle X-ray scattering) effectuées sur la ligne SWING du Synchrotron SOLEIL, ont confirmé que SUFU est monomérique en solution avec rayon de giration de 31 Å calculé à partir de la courbe de Guinier et une masse moléculaire de 56 kDa. Les mesures de SAXS nous ont permis de calculer une enveloppe *ab initio* de SUFU. Cette enveloppe montre aussi que SUFU a une forme allongée et elliptique en solution avec un volume de 111 nm<sup>3</sup>. À partir du modèle obtenu par SAXS et des données de CD, nous avons pu sélectionner un modèle pour le domaine C-terminal de SUFU ayant la même taille et le même contenu de structure secondaire. Les résultats indiquent que SUFU a deux domaines bien repliés avec un long « Linker » non structuré qui relie les deux domaines permettant ainsi aux deux domaines d'assurer des interactions avec les différents partenaires. L'analyse du domaine N-terminal cristallisé de SUFU, avec le programme « Evolutionary trace » a permis d'identifier des résidus très conservés rassemblés sur une face très accessible de la protéine comme le résidu Aspartate 159, très important pour l'activation de GLI 1 (Merchant 2004).

En conclusion, cette étude, combinant biophysique et bioinformatique a permis d'apporter des informations structurales indispensables à la compréhension de la fonction de SUFU. En effet, nous avons pu montrer, d'une part, que SUFU entier est monomérique en solution et composé de deux domaines N-terminal et C-terminal bien repliés et reliés avec un long « Linker » permettant une certaine mobilité des deux domaines pour assurer les interactions avec les partenaires. D'autre part, l'analyse de séquence de cette protéine a permis de mettre en évidence des résidus très conservés et accessibles qui sont indispensables à la fonction de SUFU. Ces résultats suggèrent que SUFU pourrait jouer le rôle de plateforme d'interaction protéine-protéine.

**b. Article :**

**Biophysical studies show that full length Suppressor of Fused has an elongated structure compatible with its protein- protein interaction function in the Hedgehog signalling pathway.**

Jabrani, Amira <sup>1</sup> ; LeDu, Marie-Helene <sup>2</sup> ; Biou, Valerie <sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales UPR 3082, CNRS 91198  
Gif sur Yvette, France.

<sup>2</sup> CEA/DSV/IBiTec-S/SB2SM, Laboratoire de Biologie Structurale et  
Radiobiologie, bat 144, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette.

<sup>3</sup> present address IBPC.

\*Corresponding author Biou, Valerie biou@ibpc.fr

## SUMMARY

Suppressor of Fused (SUFU) is a very conserved protein that acts as a negative regulator of the Hedgehog (Hh) signalling pathway, a major determinant of cell differentiation and proliferation. SUFU is part of a multi protein cytoplasmic signal transducing complex, where it interacts with several partners, including the transcription factor cubitus interruptus, that functions either as a repressor or as a transcription activator, according to the Hh activation state. Other partners include kinase Fused and myeloid leukaemia factor. Its deletion in mammals has devastating effects on the embryo development. Little is known about the structural and biophysical properties of this protein. We expressed and characterised recombinant full length SUFU from *Drosophila melanogaster*. Synchrotron Radiation Circular Dichroism indicated an alpha plus beta secondary structure, with a thermal unfolding resulting in an enrichment in beta strand. Small angle X-ray scattering and SEC-MALLS showed that SUFU is an elongated monomeric protein, and the *ab initio* calculation of molecular envelope accommodates the structures of two compact domains at the amino and carboxy termini, along with less structured linker. Evolutionary trace aminoacid sequence analysis of the known N-terminal domain of human SUFU (Merchant et al, 2004), showed a side rich in conserved aminoacids, while the opposite side is open to variation. Brought together, our results show that SUFU solution structure is adapted to its multi-protein interaction function as it presents an extended and conseved accessible surface for its partners in the Hedgehog complex.

**Keywords:** Hedgehog pathway, small angle X-ray scattering, circular dichroism, solution structure.

**Abbreviation list:** Hh, hedgehog; CI, cubitus interruptus; HTC, hedgehog transduction complex; Ptc, Patched; SAXS, small angle X-ray scattering; CD, circular dichroism, SEC, size exclusion chromatography; MALS, multiple angle light scattering; QELS, quasi elastic light scattering; RI, refractive index.

**INTRODUCTION**

The hedgehog pathway is crucial during numerous steps of animal embryo development where it controls cell division, survival, migration and differentiation. Cell fate is determined as a response to different Hedgehog (Hh) protein concentrations. In *Drosophila* imaginal discs, Hh is produced by the posterior compartment, and anterior cells respond to this morphogen signal by expressing different target genes according to their concentration and their distance to the antero-posterior boundary (Vervoort et al., 1999; Wang and Holmgren, 1999). The gene expression is regulated via a family of zinc finger transcription factors of the Gli family (Gli1-Gli3 in mammals, *cubitus interruptus*, CI in *Drosophila*). At the cell membrane, the Hh protein is received by transmembrane protein Patched, which catalytically represses "G-Protein Coupled Receptor - like" Smoothened in the absence of Hh (Ogden et al., 2008; Ruel et al., 2007). Inside the *Drosophila* cell, CI is regulated by a multi-protein complex called the Hedgehog Transducing Complex (HTC) whose composition varies according to the Hh activation state (Monnier et al., 1998; Robbins et al., 1997; Stegman et al., 2000). In the absence of binding of the Hh ligand to Patched, the HTC includes the kinesin Costal2, the kinase Fused, the protein SUFU and the transcription factor CI, and it binds microtubules (Farzan et al., 2008; Sisson et al., 1997). Kinases are recruited to promote CI phosphorylation, ubiquitination and its targeting to the proteasome (Aza-Blanc et al., 1997; Smelkinson and Kalderon, 2006; Wang and Price, 2008). As a result, CI is partially digested into a shorter form that acts as a repressor towards Hh target gene expression. On the other hand, when Hh binds Ptc, Smo is phosphorylated forming a homodimer, and the HTC leaves microtubules to bind the Smo C-terminal tail at the plasma membrane (Shi et al., 2011; Zhao et al., 2007). Full length CI is activated via an unknown process and it triggers transcription of target genes in the nucleus (Aza-Blanc et al., 1997; Ohlmeyer and Kalderon, 1998).

Suppressor of Fused (SUFU) was discovered for its ability to counteract Hh pathway overactivation in Fused loss of function mutants, suggesting that SUFU has an inhibitory role (Preat, 1992). It was later shown to be associated to the HTC in the cytoplasm (Stegman et al., 2000). In spite of its high sequence conservation, SUFU removal in mammals and *Drosophila* has very contrasted effects: in *Drosophila*, SUFU loss of function mutants do not show important developmental or reproduction behaviour (Preat, 1992), whereas SUFU deficient mice die before birth due to severe defects linked to Hh upregulation (Barnfield et al., 2005; Cooper et al., 2005).



Regardless of those phenotypic differences, drosophila SUFU can restore proper Hh signalling in SUFU deficient mammalian cells, showing that it has a conserved role across species (Chen et al., 2009). In all organisms, SUFU is seen both in the cytoplasm and in the nucleus, associated with CI/Gli and enhances Gli affinity for DNA (Pearse et al., 1999; Sisson et al., 2006). SUFU is phosphorylated in the presence of Hh and this phosphorylation plays a role in the modulation of SUFU function in drosophila and vertebrates (Chen et al., 2011; Dussillol-Godar et al., 2006; Ho et al., 2005).

Drosophila SUFU is a 468 amino acid, 53 kDa, protein composed of two highly conserved regions at the N- and C-termini (42 and 29% identity between human and fly sequences, respectively), spaced by a less conserved linker of about 80 amino acids. The N-terminal region is defined in sequence databases as a PFAM (Finn et al., 2010) domain that exists in animals and bacteria, whereas the C-terminal region is found only in animals. The crystal structure of the N-terminal region of the human protein shows an alpha plus beta domain followed by an additional helical domain (Merchant et al., 2004).

With the aim to further understand the functional importance of SUFU, we undertook its structural study. We expressed and purified full length SUFU from drosophila with a 6-Histidine tag connected by a linker to the rest of the protein, resulting in a 56 kDa construct. We characterised its structure using circular dichroism and small angle X-ray scattering in solution and showed that it is an elongated, monomeric protein. Bioinformatics analyses on the N-terminal domain crystal structure (Merchant et al., 2004) disclosed a face with very conserved exposed residues that can potentially bind a conserved partner.

## **RESULTS**

### 1) Circular dichroism measurements on SUFU in solution show that it is an alpha plus beta protein that enriches in $\beta$ -structure during thermal unfolding.

Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD) spectra were collected at the DISCO beamline at SOLEIL synchrotron (Giuliani et al., 2009). The advantage of SRCD, with respect to traditional instruments, is that the beam intensity is such that very short optical paths can be used with  $\mu$ l volumes of concentrated protein solution. Proteins can then be studied in salt solutions that absorb in the far UV and would lead to highly noisy spectra in laboratory dichrographs. We compared SUFU stability and folding at different pH and in different buffers. Supplementary figure 1 shows that the spectrum in Hepes buffer is deeper than in other buffers, showing a higher

amount of secondary structure. Moreover, analysis of the spectra in terms of secondary structures using the BestSel method (Kardos et al, to be published) showed that the protein has more helical structure in Hepes pH 7.5 buffer than in phosphate pH 6.5 and tris pH 8.5, respectively, while the amount of beta structure remains stable (figure 1A). Overall, Bestsel indicates that SUFU in Hepes at 25°C contains 28% helix, 15% strand and 14% turn. This is compatible with the structure of the N-terminal domain of the human protein that contains 28% helix, 23% strand and 6% turn. We subtracted the secondary structure contents of the known crystal structure, and considered that the first 39 amino acids, that constitute the Histidine tag and linker, are disordered in our construct. As a result, we calculated that the 210 amino acids in the C-terminal region are likely to have the following secondary structure contents: 15% helix, 24%  $\beta$ -strand, 27% turns and 36% others. The CD results therefore indicate that the C-terminal region may also have an alpha plus beta structure. Indeed, a secondary structure prediction of this region using the Prof server (<http://www.aber.ac.uk/~phiwww/prof/>) indicates that the central 80 amino acids are likely to mainly adopt a random conformation with few helical structures, while the last 130 residues are likely to show the content of helix and strand calculated from the CD analysis and constitute a compact domain.

Figure 1B shows the set of spectra during thermal unfolding. The spectra present an isobestic point showing that the transition occurs between two states. Program BestSel analyses the thermal unfolding as an increase in beta structure, and a decrease in helix, while turns and "other conformations", i.e., random, remain almost constant (figure 1C). Indeed, this trend occurs for many proteins, even an all-helical protein such as myoglobin, acquires beta-type conformations during thermal unfolding and aggregation (Fändrich et al., 2003; Yang et al., 2003).

Plots of CD signal observed at a given wavelength during thermal unfolding enables us to calculate the enthalpy and entropy of unfolding and the mid-point temperature of the system. Figure 1D shows the CD signal variation as a function of temperature and Table 1 lists energy values calculated from SUFU in Hepes buffer, the conditions in which SUFU presents the highest proportion of secondary structure. The mid-point temperature is quite similar in all buffers, of the order of 40°C. The enthalpy of unfolding is around 40 kcal mol<sup>-1</sup>, showing an endothermic unfolding with a moderate energy, in agreement with the modest T<sub>m</sub>. The entropy change, however, is negative, indicating an increase in hydrophobic interactions, maybe due to protein aggregation and beta structure enrichment. The variation of the CD signal as a function of temperature is monotonic. It seems that both domains unfold at the same time, as the curve does

not present two distinct transitions. Two additional buffers were studied for pH screening. As shown in Table 1, SUFU is more temperature stable in Hepes at pH 7.5 than in Tris at pH 8.5 and in phosphate buffer at pH 6.5. In summary, CD measurements showed that SUFU is an alpha plus beta protein that is more stable in Hepes-KF buffer at pH 7.5, that it is probably partly disordered even at low temperatures, and that its energy of unfolding is rather low.

Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD) spectra were collected at the DISCO beamline at SOLEIL synchrotron (Giuliani et al., 2009). The advantage of SRCD, with respect to traditional instruments, is that the beam intensity is such that very short optical paths can be used with  $\mu\text{l}$  volumes of concentrated protein solution. Proteins can then be studied in salt solutions that absorb in the far UV and would lead to highly noisy spectra in laboratory dichrographs. We compared SUFU stability and folding at different pH and in different buffers. Supplementary figure 1 shows that the spectrum in Hepes buffer is deeper than in other buffers, showing a higher amount of secondary structure. Moreover, analysis of the spectra in terms of secondary structures using the BestSel method (Kardos et al, to be published) showed that the protein has more helical structure in Hepes pH 7.5 buffer than in phosphate pH 6.5 and tris pH 8.5, respectively, while the amount of beta structure remains stable (figure 1A). Overall, Bestsel indicates that SUFU in Hepes at 25°C contains 28% helix, 15% strand and 14% turn. This is compatible with the structure of the N-terminal domain of the human protein that contains 28% helix, 23% strand and 6% turn. We subtracted the secondary structure contents of the known crystal structure, and considered that the first 39 amino acids, that constitute the Histidine tag and linker, are disordered in our construct. As a result, we calculated that the 210 amino acids in the C-terminal region are likely to have the following secondary structure contents: 15% helix, 24%  $\beta$ -strand, 27% turns and 36% others. The CD results therefore indicate that the C-terminal region may also have an alpha plus beta structure. Indeed, a secondary structure prediction of this region using the Prof server (<http://www.aber.ac.uk/~phiwww/prof/>) indicates that the central 80 amino acids are likely to mainly adopt a random conformation with few helical structures, while the last 130 residues are likely to show the content of helix and strand calculated from the CD analysis and constitute a compact domain.

Figure 1B shows the set of spectra during thermal unfolding. The spectra present an isobestic point showing that the transition occurs between two states. Program BestSel analyses the thermal unfolding as an increase in beta structure, and a decrease in helix, while turns and "other conformations", i.e., random, remain almost constant (figure 1C). Indeed, this trend occurs for

many proteins, even an all-helical protein such as myoglobin, acquires beta-type conformations during thermal unfolding and aggregation (Fändrich et al., 2003; Yang et al., 2003).

Plots of CD signal observed at a given wavelength during thermal unfolding enables us to calculate the enthalpy and entropy of unfolding and the mid-point temperature of the system. Figure 1D shows the CD signal variation as a function of temperature and Table 1 lists energy values calculated from SUFU in Hepes buffer, the conditions in which SUFU presents the highest proportion of secondary structure. The mid-point temperature is quite similar in all buffers, of the order of 40°C. The enthalpy of unfolding is around 40 kcal mol<sup>-1</sup>, showing an endothermal unfolding with a moderate energy, in agreement with the modest T<sub>m</sub>. The entropy change, however, is negative, indicating an increase in hydrophobic interactions, maybe due to protein aggregation and beta structure enrichment. The variation of the CD signal as a function of temperature is monotonic. It seems that both domains unfold at the same time, as the curve does not present two distinct transitions. Two additional buffers were studied for pH screening. As shown in Table 1, SUFU is more temperature stable in Hepes at pH 7.5 than in Tris at pH 8.5 and in phosphate buffer at pH 6.5. In summary, CD measurements showed that SUFU is an alpha plus beta protein that is more stable in Hepes-KF buffer at pH 7.5, that it is probably partly disordered even at low temperatures, and that its energy of unfolding is rather low.

## 2) SUFU is an elongated monomer in solution.

i) SEC-MALLS measurements were carried out (see Materials and Methods). The gel filtration column chromatogram showed that the protein migrates as a single species (figure 2A); light scattering revealed that it has a measured molecular weight corresponding to a monomer, and a hydrodynamic radius of 31Å (Table 2). Those results showed that SUFU is monodisperse and allowed us to run SAXS measurements.

### ii) SAXS measurements

Accurate SAXS measurements were conducted on beamline SWING at the SOLEIL synchrotron (David and Perez, 2009). The scattering patterns of SUFU solutions are almost identical up to a momentum transfer (Q<sub>max</sub>) of 0.5 Å<sup>-1</sup>, showing that the protein does not show any large change in structural organisation within the studied concentration range (1-4 mg/ml) (Figure 2B). In addition, the plots of the I/sigma shown in supplementary figure 2B indicates that the data shows significant signal to noise ratio and can be used in this range.

The Radius of gyration ( $R_g$ ) calculated from the Guinier plot is  $31\text{\AA}$ , consistent with the radius of hydration obtained by SEC-MALLS. The "Porod volume" that allows an independent calculation of the particle volume and size and therefore an evaluation of data quality, is of the order of  $111\text{ nm}^3$ , compatible with a particle size of 56 kDa. The calculation of the distance distribution function  $P(r)$  using indirect Fourier transform yielded a well-behaved curve with a maximum particle dimension  $R_{\text{max}}$  of  $200\text{\AA}$  (suppl. fig.1A). The associated  $R_g$  was  $36\text{\AA}$  and the forward scattering  $I_0$  value allows calculating a particle mass of 56 kDa, confirming that the particle is a monomer and that it is monodisperse in solution. The envelope *ab initio* calculation using programs GASBOR, DAMMAVER and DAMFILT (Franke and Svergun, 2009), yielded a series of elongated, ellipse-like, shapes resulting in an averaged envelope of maximal dimensions 104 by  $57\text{\AA}$ , that fits the experimental data well. This envelope has a radius of gyration of  $30\text{ \AA}$ . Given the consistency of those results, it is likely that the actual particle shape is similar to this. The Kratky plot (figure 2B, inset) denotes a mostly compact structure with some unfolded regions, probably due to disorder in the His-tag and long linker at the amino terminus, as well as the inter-domain region.

In an attempt to model the whole protein structure, we generated a rough model of the C-terminal domain by searching for a structure in the protein data bank that had the same length and secondary structure contents as calculated using the circular dichroism data (130 aminoacids, 15% helix and 24% strand), choosing structure 1JC5 (Methylmalonyl-CoA Epimerase). This domain was assembled with that of the human N-terminal domain of SUFU (pdb code 1M1L) and linkers (38 residues at the N-terminus and 70 residues between the two domains) were manually built using Pymol graphics program ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)), to generate initial models. Two starting models were built with different linker conformations. The first one had all-helix, and the second one had all-beta strand structures, both had very large volumes due to the straightness of the linkers that protruded away from the folded domains. Those two models were used as an input to the "autobuild" option of the program Modeller (Eswar et al., 2008) that calculated a series of five structures for each input, corresponding to the sequence of drosophila SUFU. Starting from structures that had both very large expansions, the helical linkers folded back onto the two domains, forming an oval shaped, compact structure, while the beta linkers remained much more extended. Theoretical diffusion curves were then calculated for each Modeller output structures and fitted to the experimental SAXS data, using program CRY SOL. The "beta structure" group had chi values between 25 and 35, while the "helical structure" group had values

between 11 and 15. Figure 2B shows the fit between the experimental data and the calculated curve for the chosen model. It is quite good down to  $s=0.18 \text{ \AA}^{-1}$ . The agreement observed shows that, although the fine structures of the molecule poorly fit the SAXS data, the overall domain orientation is correct.

In the same way, the model that had the lowest chi value could be fitted into the envelope using program SUPCOMB (figure 2C), showing that SUFU is likely to have two domains with alpha+beta secondary structure, forming an elongated but compact protein.

In summary, the two domains of SUFU are organised as an elongated protein and thus able to perform interactions with different partners or domains of their partners. This is in agreement with previous data showing that the N-terminus and the C-terminus of SUFU interact with different parts of CI (Merchant et al., 2004).

### 3) Sequence studies show residues important for SUFU protein-protein interaction function.

We performed evolutionary trace calculations starting from the crystal structure of the human SUFU amino terminal domain 1M1L. This method generates a multiple sequence alignment and maps conserved residues onto the 3D structure, thus showing where important residues are positioned (Innis et al., 2000). In the present case, the SUFU N-terminal domain shows a remarkable accessible surface, with one side open to variations (appears in grey on figure 3), whereas the opposite side presents very conserved, clustered residues (in yellow and red). Indeed, the latter conserved surface is suitable for protein-protein interaction, as in the crystal structure of 1M1L, it makes contacts with the B subunit in the same asymmetric unit. Even though SUFU is a monomer, the examination of this crystallographic interface shows that some residues are oriented so that they can interact with other proteins. This interface comprises conserved tyrosine 147 that makes interactions with many other residues, and asparagine 153 that is present in a majority of sequences and also makes interactions via its side chain. Moreover, the side chain of Aspartate 159 that was shown to be important for Gli1 activation, is also accessible on this face (Merchant et al., 2004). In summary, we have shown that SUFU has many properties that make it a good scaffold protein.

## DISCUSSION

Using SRCD, we have shown that SUFU is an alpha-beta protein with an unfolding temperature around 40°C. We also showed that, in spite of an almost constant transition temperature, the energy and enthalpy of unfolding estimated from CD are higher in Hepes buffer than in Tris or phosphate. Thus, Hepes is a more stabilising buffer for SUFU.

The radius of gyration measured using the SAXS data is of the order of 31Å, while a theoretical calculation assuming the protein is globular with 496 amino acids, gives a 23.6Å estimation. (Narang et al., 2005). This large Rg is compatible with the rod-like envelope obtained from the SAXS data using *ab initio* programs, showing that the protein is elongated in an ellipsoidal shape, rather than globular. In agreement with this finding, we were able to fit a model including the crystal structure of human SUFU N-terminal domain, along with a model representing the C-terminal compact region, chosen to respect the secondary structure obtained by SRCD, into the SAXS envelope. This elongated shape is compatible with the fact that both domains are accessible for interactions with partners, and accounts for the observations (by several groups) that SUFU can bind both CI domains independently, and also form complexes with several partners such as Fused and CI at the same time (Merchant et al., 2004; Monnier et al., 1998).

The amino acid sequence of SUFU has no homology with any protein of well-defined function and sequence analysis does not yield information about a possible function. All publications exploring SUFU protein point to a role as a scaffolding protein that interacts with others to determine their fate or cellular location. Moreover, its sequence is highly conserved, showing that it constitutes an important piece in the proteome. The amino terminal region, termed SUFU domain PF05076 in PFAM database, has homologues in bacteria, whilst the C-terminal region is found only in animals. Interestingly, a recent genetic analysis of bacterial immunity proteins against nucleic acid degrading toxins, found that the N-terminus of SUFU is conserved in bacteria, and often associated with other domains in antitoxin scaffold proteins capable of binding partners such as toxins (Zhang et al., 2011). The authors propose that the SUFU domain, often associated to Smi1/Knr4 domains, plays a similar role to the SUKH domain superfamily (named for Syd, US22, Knr4 homology) in the recognition of toxins by bacteria and therefore is a platform for protein-protein interactions. Interestingly, the structure of a protein of unknown function from *Nesseiria gonorrhoeae* has a very similar fold to SUFU 1M1L structure (2.6Å root mean square deviation), while sharing only 15% sequence identity (Das et al., 2010). The only

conserved residues are located on a single  $\beta$ -strand and mostly interact via hydrophobic interactions with other residues, indicating that the core of the protein is important for its function. In conclusion, the N-terminal domain of animal SUFU is most probably a platform to establish complexes with other proteins from the HTC via its conserved face. The C-terminal region from animals also has a highly conserved sequence, which indicates that its fold is important for its function. Our SAXS results, combined with the secondary structure contents deduced from the SRCD analyses, show that SUFU constitutes a compact and elongated module. It is likely that the C-terminal domain is positioned in such a way that it can establish interactions with its partners, as well as with the N-terminal domain. Only knowledge of the C-terminus structure will tell if those residues stabilise the 3D structure or interact with other proteins or ligands.

## TABLES

Table 1: Thermodynamic values for SUFU in three buffers.

Buffer	pH	wavelength (nm)	DH (kcal. mol <sup>-1</sup> )	DS (cal. mol <sup>-1</sup> )	Tm (K/ °C)	DG (kcal. mol <sup>-1</sup> )
Hepes	7.5	208	41.8	-132	312/ 39	-83.0
Hepes	7.5	192	40.4	-129	310/ 37	-80.4
Tris	8.5	208	28.4	-90	314/ 41	-56.7
Tris	8.5	193	28.6	-91	313/ 40	-57.1
PO4	6.5	193	21.6	-68	312/ 39	-52.8

Table 2: Solution studies show that SUFU is an elongated monomer.

Sec-MALLS Rh (Å)	Sec-MALLS mass (kDa)	SAXS <sup>^</sup> Rg Guinier / P(r) (Å)	SAXS <sup>^</sup> I(0) Guinier / P(r) (Å)	SAXS <sup>^</sup> mass I(0) / Porod * (kDa)	Particle theoretical mass (kDa)
31	56.7	30.5 /36.5	4.1e <sup>-4</sup> / 4.3e <sup>-4</sup>	56 / 56	56.1

<sup>^</sup> The SAXS data used here were for the highest concentration: 4mg/ml. the other two dilutions gave similar data. \* The "Porod" particle mass was calculated as VolPorod/2

## MATERIALS AND METHODS

### 1) SUFU Cloning, Expression, and Purification

The SUFU gene was cloned using the Gateway technology (Invitrogen), into the pDest17 (Invitrogen) expression vector according to standard Gateway<sup>TM</sup> protocols. The final construct



encoded a N-terminal hexahistidine tag and a TEV protease cleavage site before the gene of interest. The resulting plasmid was used to transform *E. coli* strain BL21 (DE3) STAR. Cells were grown in 2YT medium at 37 °C until the optical density reached 0.6 and protein expression was induced with 0.2 mM isopropyl  $\beta$ -thiogalactoside overnight at 20 °C. Bacterial cells were recovered by centrifugation at 5,000 rpm for 15 min and frozen at -80°C.

Lysis was achieved in buffer (50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5% glycerol). Cells were thawed with shaking in the presence of 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 10  $\mu$ g/ml of DNase for 1 hour. Soluble proteins were separated from inclusion bodies and cell debris by a 35 min centrifugation step at 18,000 rpm. After filtration on a 0.45  $\mu$ m filter, supernatant was loaded on a 1 mL HisTrap nickel affinity column (GE Healthcare) equilibrated in lysis buffer. The column was washed with the same buffer and eluted with a gradient of 300 mM imidazole. The eluted protein was further purified on a preparative HiLoad 16/91 XK Superdex 200 (GE Healthcare) gel filtration column in a buffer containing 10 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM  $\beta$ -Mercapto-ethanol. Purified material was concentrated to appropriate concentrations on a Vivaspin (Sartorius) centrifugal filter unit with a 10-kDa cutoff, aliquoted and frozen in liquid nitrogen for further use.

2) Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) was measured at DISCO beamline (SOLEIL synchrotron source).

SUFU protein was purified in Tris-HCl 20mM pH 8.5, NaCl 150 mM,  $\beta$ -mercapto 2 mM, then aliquots were dialysed against Hepes 20 mM pH 7.5, KF 100 mM or phosphate 20 mM pH 6.5, KF 100 mM. All sample concentrations were measured using the absorbancy after centrifugation at 280nm and just prior to measurement, using a theoretical extinction coefficient of 64860 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. All concentrations were between 4.1 and 4.3 mg/ml.

The beamline monochromator was calibrated using a camphorsulfonic acid solution prior to measurements. One microlitre of sample was deposited on one face of a calcium fluoride circular cuvette (Hellma), then the second face was carefully positioned and the cuvette closed by capillary force. Interferometry measurement showed the optical path to be 2.3  $\mu$ m. The cuvette was placed in an airtight, metal sample holder that was positioned in the beamline Peltier temperature controlled chamber, allowing quick temperature changes with very little evaporation. Spectra were measured between 280 and 170 nm, with four measurements being averaged into

the final spectrum. Thermal unfolding measurements were performed by averaging three spectra collected in steps of 5°C between 15 and 95 °C. Buffer spectra were taken in the same conditions for subtraction from the protein spectra. Spectra were then processed for buffer subtraction and scaling using the CDTools program (Lees et al., 2004). Secondary structure decomposition was done using J. Kardos' program BestSel (to be published). Enthalpy, entropy and unfolding temperature  $T_m$  were calculated using Kaleidagraph linear and curve fitting tool according to equations published in (Greenfield, 2006).

### 3) Molar Mass and Hydrodynamic Radius Determination by SEC/MALS/UV/QELS/RI.

Samples (30  $\mu$ L at 5mg/mL) were analysed by size-exclusion chromatography (SEC) using a Shodex KW-803 column (Phenomenex) mounted on a Shimadzu Prominence HPLC system (Shimadzu) at a flow rate of 0.5 mL/min in 50 mM Tris pH 7.4, 200 mM NaCl. Multi-angle static light scattering (MALS) was measured with a MiniDAWN TREOS. Refractometry (RI) was monitored using an Optilab T-rEX refractometer (Wyatt Technology), and quasi-elastic light scattering (QELS), with a WyattQELS (Wyatt Technology). Mass and hydrodynamic radius calculation was performed with ASTRA software (Wyatt Technology) using a  $dn/dc$  value of 0.183 mL/g.

4) SAXS data were collected on the beamline SWING (SOLEIL synchrotron, St Aubin, France), with a sample-detector distance of 1818 mm, wavelength 0.1033 nm. The sample holder compartment was set to 16°C. Prior to measurements, the protein was dialysed against buffer (Tris 10 mM pH8, NaCl 150 mM,  $\beta$ - mercapto ethanol 2 mM). The protein and buffer solutions were stored into the sample changer as follows. Fifty micro litres of each protein dilution (4, 2, 1 mg/ml) were pipetted into an insert tube, itself inserted into a glass vial. A test for radiation damage was first performed on 5  $\mu$ l of the most dilute solution, and showed that the successive diffusion curves did not show any visible decay. Then the three protein dilutions and buffer were injected into the beamline capillary and measurements of 1s followed by 0.5s delay were triggered. Image processing, buffer subtraction and preliminary measurements were done using FOXTROT software developed at the SOLEIL synchrotron. Further analysis: Guinier and Kratky plots, Radius of gyration  $R_g$  and intensity at origin  $I_0$  calculation were performed with the ATSAS program suite (Konarev et al., 2006). Mass calculation from  $I_0$ , was done using equation

$M = I_0/C \times (N_A / \Delta\rho^2) \times (I_{0w}^{th} / I_{0w}^{exp})$  where  $I_{0w}^{th}$  is the theoretical intensity at the origin and  $I_{0w}^{exp}$  is the experimental intensity at the origin for water.  $\Delta\rho$  is the solvent electron density contrast between the sample and the buffer,  $N_A$  is Avogadro's number,  $I_0$  is the sample intensity at the origin and  $C$  is the sample concentration. The "Porod volume"  $V_p$  was calculated using equation  $V_p = 2\pi^2 I(0)/Q$  where  $Q = \int_0^\infty s^2 [I(s) - K] ds$  with  $s$  being the scattering vector and where  $K$  a constant determined to ensure the asymptotical intensity decay proportional to  $s^{-4}$  at higher angles. This calculation is implemented in program Primus (Konarev et al., 2003). The molecular mass was deduced from  $V_p$  using the crude approximation:  $V_p$  (in  $\text{nm}^3$ )  $\approx 2 \times \text{mass}$  (kDa) (Mertens and Svergun, 2010). Fifty *ab initio* envelope calculations were carried out using GASBOR22i. They were sorted according to their Chi values and those that had Chi values within 1.5 root mean square deviation of the lowest one were kept for input into DAMSEL, DAMSUP and DAMMAVER.

5) Molecular modelling. Firstly, the amino terminal crystal structure of human SUFU 1M1L was used for the N-terminal domain. Secondly, a secondary structure prediction was calculated for the whole aminoacid sequence using program PROF (Ouali and King, 2000) and the C-terminal region of SUFU was modelled according to the secondary structure of Methionyl CoA Epimerase 1JC5, chosen because it had the same secondary structure contents and length as the region we wanted to model. Thirdly, those 2 domains were brought together in a relative orientation that fitted into the envelope calculated using GASBOR. Then the linkers were added as poly-alanine chains and this preliminary model was input for side chain building and energy minimisation and simulated annealing in MODELLER, using the autobuild option (Eswar et al., 2007). The resulting models were evaluated as described in the Results.

##### 5) Molecular modelling.

Firstly, the amino terminal crystal structure of human SUFU 1M1L was used for the N-terminal domain. Secondly, a secondary structure prediction was calculated for the whole aminoacid sequence using program PROF (Ouali and King, 2000) and the C-terminal region of SUFU was modelled according to the secondary structure of Methionyl CoA Epimerase 1JC5, chosen because it had the same secondary structure contents and length as the region we wanted to

model. Thirdly, those 2 domains were brought together in a relative orientation that fitted into the envelope calculated using GASBOR. Then the linkers were added as poly-alanine chains and this preliminary model was input for side chain building and energy minimisation and simulated annealing in MODELLER, using the autobuild option (Eswar et al., 2007). The resulting models were evaluated as described in the Results.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1:** circular dichroism studies of SUFU show that it contains more helix in Hepes buffer and that it becomes richer in beta strand upon thermal unfolding. A, graph of secondary structure evaluation in three different buffers; B, graph of secondary structure evaluation in Hepes buffer at three different temperatures; C, CD spectra of SUFU in Hepes buffer at different temperatures D, variation of CD signal at 192 (orange) and 208 nm (red) as a function of temperature.

**Figure 2:** Sec-MALLS and SAXS measurements of SUFU in solution

A, sec-malls UV absorption curve (blue) with mass (red) shows that the particle has a constant mass across the HPLC elution peak, and that it does not contain aggregates. B, superposition of SUFU scattering curves at three concentrations: pink, 4 mg/ml; light blue, 2 mg/ml; dark blue, 1mg/ml. Inset, Kratky plot at 4 mg/ml shows that the SUFU particle is mostly folded into a compact particle, with an unfolded portion. C, envelope resulting from the superposition of 11 individual *ab initio* calculations, averaged and filtered using programs specified in the text. The N-terminal domain of human SUFU pdb code 1M1L is coloured hard blue, and the C-terminal domain of SUFU, modelled from 1JC5 pdb entry, is coloured dark blue. The linkers are coloured slate-blue.

**Figure 3:** Evolutionary trace server calculation show that SUFU N-terminal domain has one conserved face and one diverging face. Top, sphere representation; bottom, ribbon representation; right, scale showing the residue colour as a function of the estimated evolutionary pressure they experience.

**Supplementary figure 1:** circular dichroism spectra of SUFU in three different buffers.

**Supplementary figure 2:** Additional SAXS curves. A) P(r) curve showing the result of indirect Fourier transform calculated using a maximum particle dimension of 200 Å. this curve represents the interatomic vectors in the protein. B) Plot of the signal to noise ratio  $I/\sigma$  for the 3 concentrations as a function of the scattering vector  $q$ .

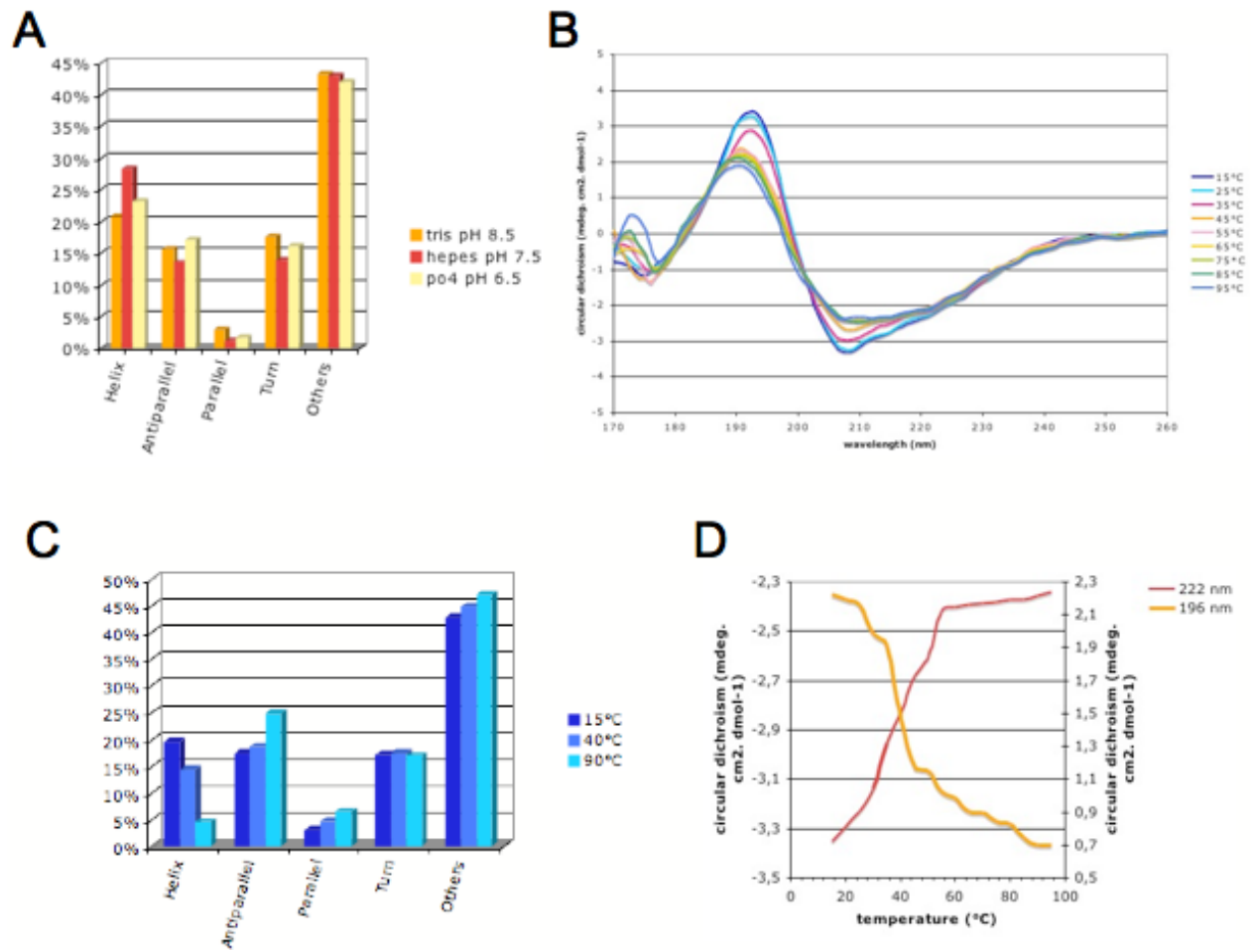


Figure 1

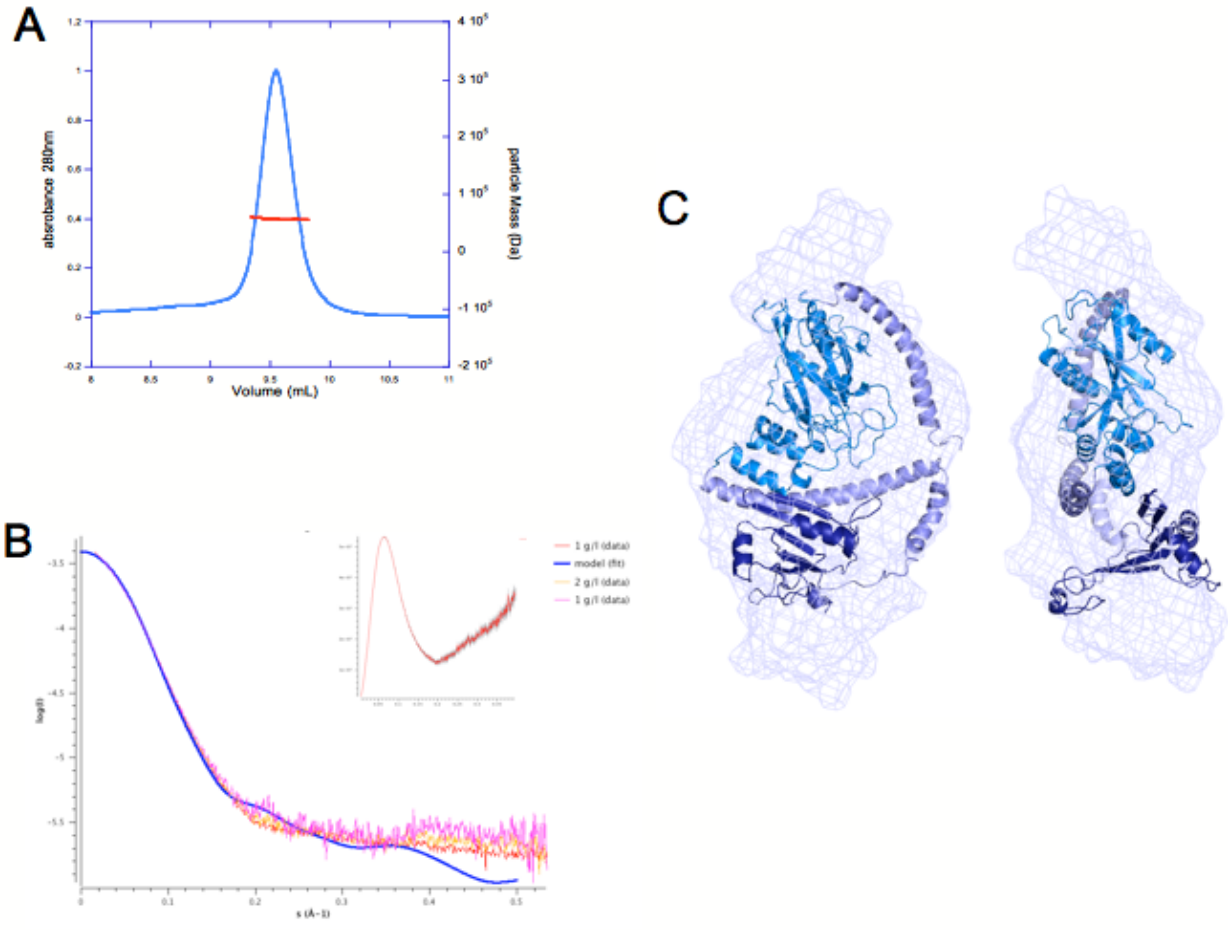


Figure 2

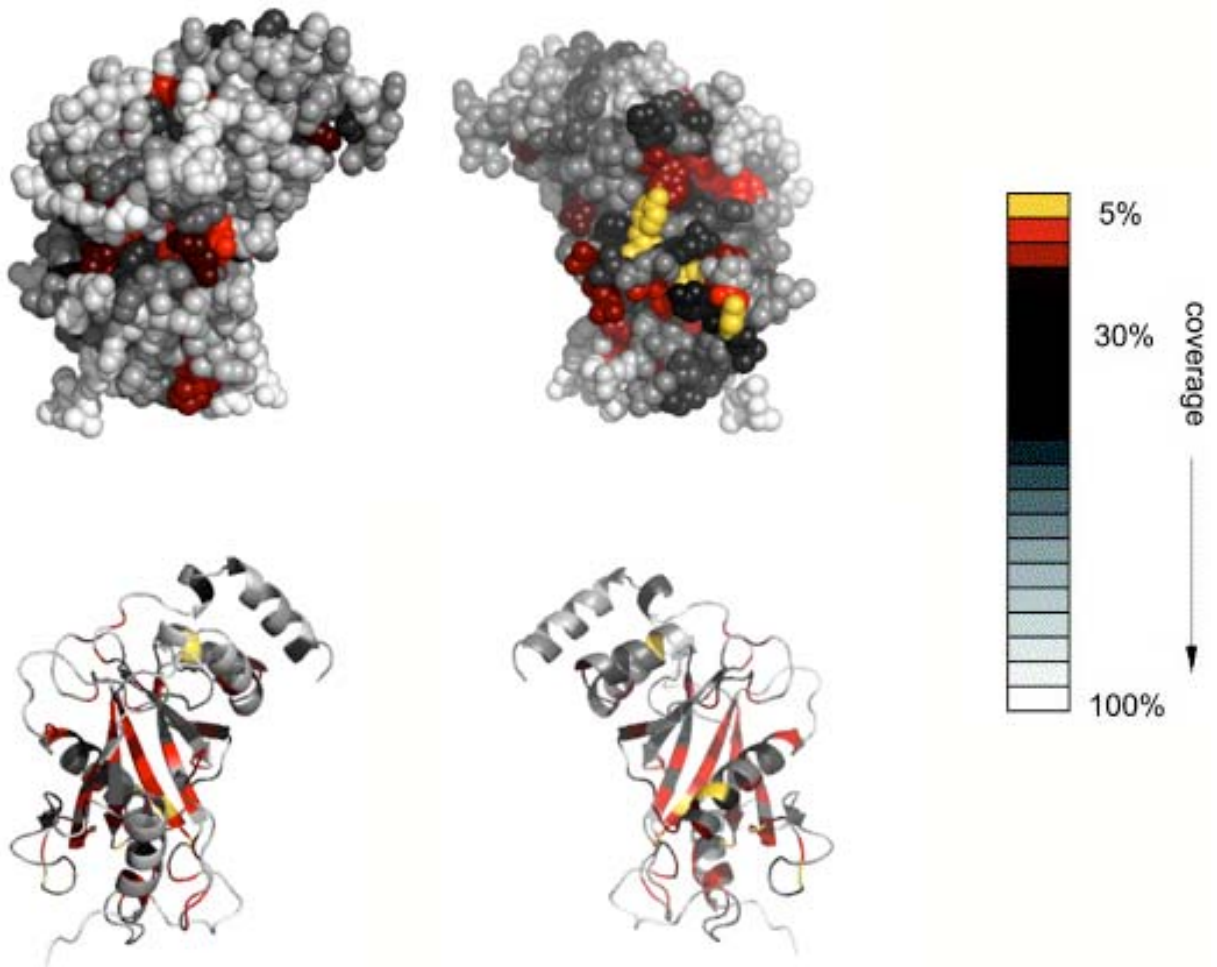
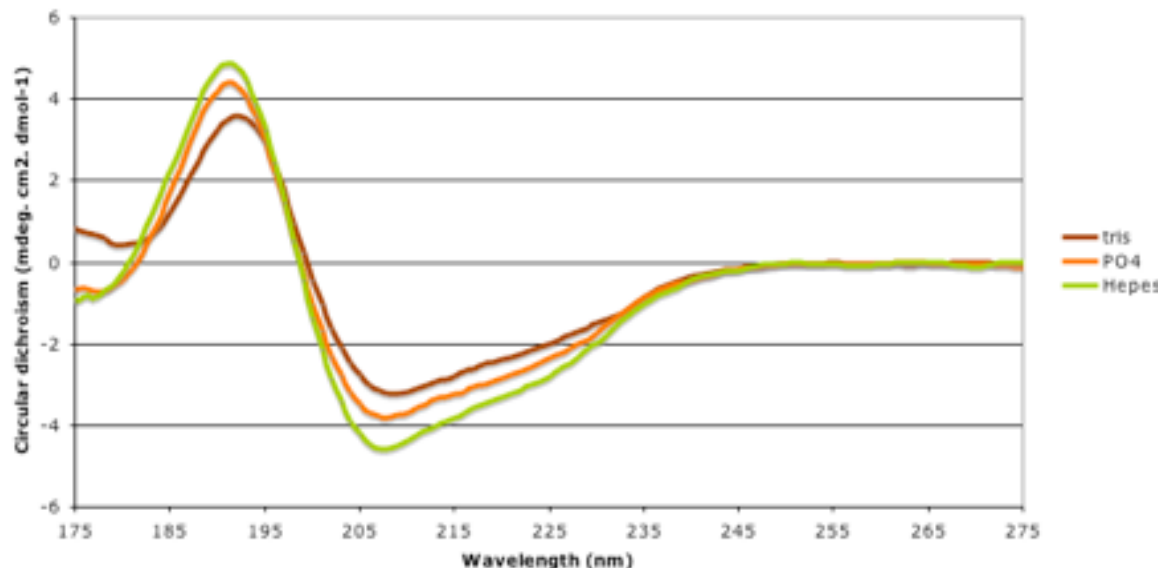
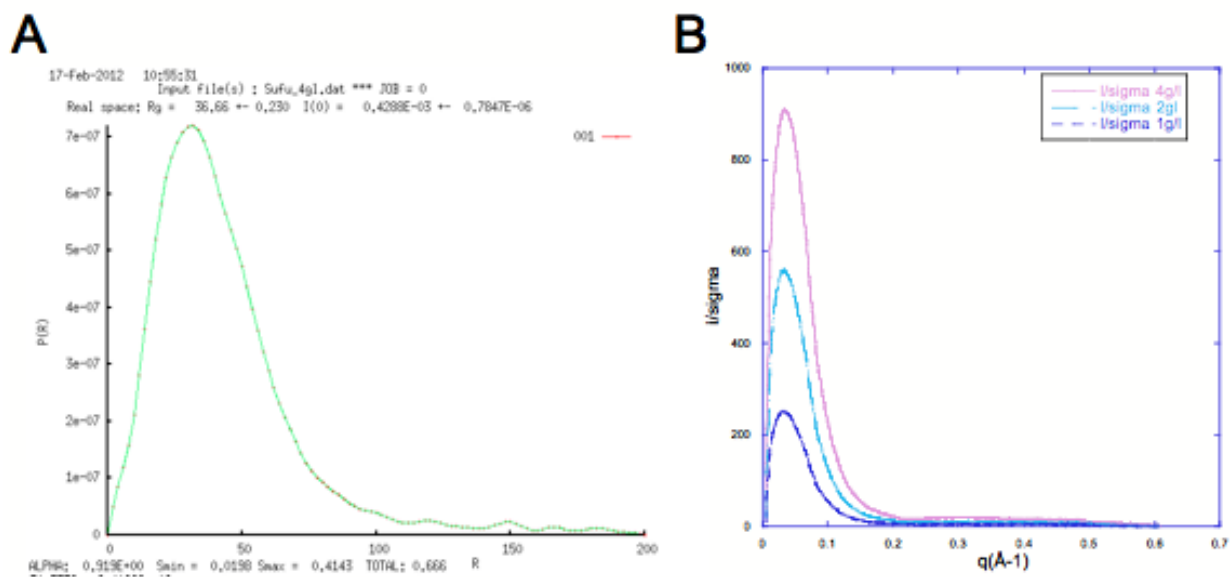


Figure 3



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



## ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Anne Plessis and Matthieu Sanial for DNA constructs and helpful discussions. We thank Javier Perez, Frank Wien, Matthieu Réfrigiers and the staffs at beamlines Swing and Disco (SOLEIL synchrotron, France) for help and advice at data collection and processing. We thank Valérie Campanacci for help with SEC-MALLS measurements and data processing. We also thank Jozsef Kardos for running his BestSel program on our data before publication.

This work has benefited from the facilities and expertise of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif) that was financed in part by the Département de l'Essonne. AJ was financed by a thesis grant from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by a fourth year grant from Association pour la Recherche contre le Cancer.

## RERERENCES

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

Barnfield, P.C., Zhang, X., Thanabalasingham, V., Yoshida, M., and Hui, C.-c. (2005). Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. *Differentiation* 73, 397-405.

Chen, M.-H., Wilson, C.W., Li, Y.-J., Law, K.K.L., Lu, C.-S., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C.-c., and Chuang, P.-T. (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes & Development* 23, 1910-1928.

Chen, Y., Yue, S., Xie, L., Pu, X.H., Jin, T., and Cheng, S.Y. (2011). Dual phosphorylation of Suppressor of fused by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem* 286, 13502-13511.

Cooper, A.F., Yu, K.P., Brueckner, M., Brailey, L.L., Johnson, L., McGrath, J.M., and Bale, A.E. (2005). Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development* 132, 4407-4417.

Das, D., Finn, R.D., Abdubek, P., Astakhova, T., Axelrod, H.L., Bakolitsa, C., Cai, X., Carlton, D., Chen, C., Chiu, H.-J., *et al.* (2010). The crystal structure of a bacterial Sufu-like protein defines a novel group of bacterial proteins that are similar to the N-terminal domain of human Sufu. *Protein Science* 19, 2131-2140.

David, G., and Perez, J. (2009). Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. *Journal of applied crystallography* 42, 892-900.

- Dussillol-Godar, F., Brissard-Zahraoui, J., Limbourg-Bouchon, B., Boucher, D., Fouix, S., Lamour-Isnard, C., Plessis, A., and Busson, D. (2006). Modulation of the Suppressor of fused protein regulates the Hedgehog signaling pathway in *Drosophila* embryo and imaginal discs. *Dev Biol* 291, 53-66.
- Eswar, N., Eramian, D., Webb, B., Shen, M.Y., and Sali, A. (2008). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 426, 145-159.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A. (2007). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 2, Unit 2 9*.
- Fändrich, M., Forge, V., Buder, K., Kittler, M., Dobson, C.M., and Diekmann, S. (2003). Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 15463-15468.
- Farzan, S.F., Ascano Jr, M., Ogden, S.K., Sanial, M., Brigui, A., Plessis, A., and Robbins, D.J. (2008). Costal2 Functions as a Kinesin-like Protein in the Hedgehog Signal Transduction Pathway. *Current Biology* 18, 1215-1220.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., *et al.* (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 38, D211-D222.
- Franke, D., and Svergun, D.I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of applied crystallography* 42, 342-346.
- Giuliani, A., Jamme, F., Rouam, V., Wien, F., Giorgetta, J.L., Lagarde, B., Chubar, O., Bac, S., Yao, I., Rey, S., *et al.* (2009). DISCO: a low-energy multipurpose beamline at synchrotron SOLEIL. *J Synchrotron Radiat* 16, 835-841.
- Greenfield, N.J. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* 1, 2527-2535.
- Ho, K.S., Suyama, K., Fish, M., and Scott, M.P. (2005). Differential regulation of Hedgehog target gene transcription by Costal2 and Suppressor of Fused. *Development* 132, 1401-1412.
- Innis, C.A., Shi, J., and Blundell, T.L. (2000). Evolutionary trace analysis of TGF-beta and related growth factors: implications for site-directed mutagenesis. *Protein Eng* 13, 839-847.
- Konarev, P.V., Volkov, V.V., Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2006). ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* 39, 277-286.
- Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., and Svergun, D.I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* 36, 1277-1282.
- Lees, J.G., Smith, B.R., Wien, F., Miles, A.J., and Wallace, B.A. (2004). CDtool, an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Analytical Biochemistry* 332, 285-289.

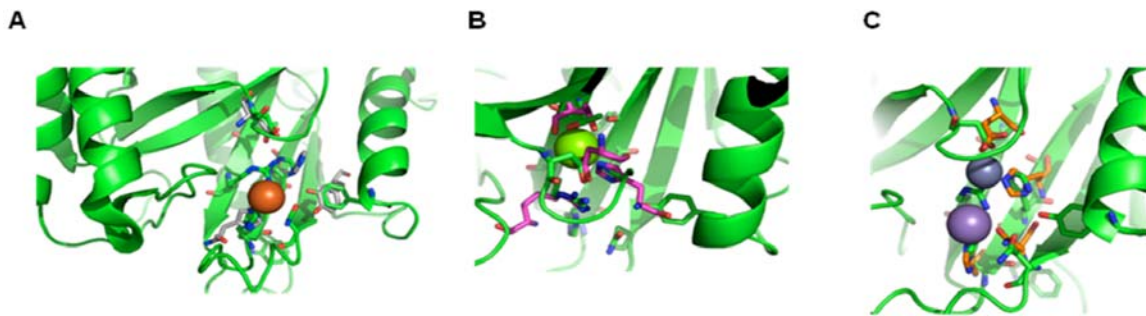
- Merchant, M., Vajdos, F.F., Ultsch, M., Maun, H.R., Wendt, U., Cannon, J., Desmarais, W., Lazarus, R.A., de Vos, A.M., and de Sauvage, F.J. (2004). Suppressor of Fused Regulates Gli Activity through a Dual Binding Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8627-8641.
- Mertens, H.D., and Svergun, D.I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol* *172*, 128-141.
- Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C., and Plessis, A. (1998). Suppressor of fused links Fused and Cubitus interruptus on the Hedgehog signalling pathway. *Current Biology* *8*, 583-586.
- Narang, P., Bhushan, K., Bose, S., and Jayaram, B. (2005). A computational pathway for bracketing native-like structures for small alpha helical globular proteins. *Phys Chem Chem Phys* *7*, 2364-2375.
- Ogden, S.K., Fei, D.L., Schilling, N.S., Ahmed, Y.F., Hwa, J., and Robbins, D.J. (2008). G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothed in Hedgehog signalling. *Nature* *456*, 967-970.
- Ohlmeyer, J.T., and Kalderon, D. (1998). Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature* *396*, 749-753.
- Ouali, M., and King, R.D. (2000). Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci* *9*, 1162-1176.
- Pearse Ii, R.V., Collier, L.S., Scott, M.P., and Tabin, C.J. (1999). Vertebrate Homologs of Drosophila Suppressor of Fused Interact with the Gli Family of Transcriptional Regulators. *Developmental Biology* *212*, 323-336.
- Preat, T. (1992). Characterization of Suppressor of fused, a Complete Suppressor of the fused Segment Polarity Gene of Drosophila melanogaster. *Genetics* *132*, 725-736.
- Robbins, D.J., Nybakken, K.E., Kobayashi, R., Sisson, J.C., Bishop, J.M., and Therond, P.P. (1997). Hedgehog Elicits Signal Transduction by Means of a Large Complex Containing the Kinesin-Related Protein Costal2. *Cell* *90*, 225-234.
- Ruel, L., Gallet, A., Raisin, S., Truchi, A., Staccini-Lavenant, L., Cervantes, A., and Therond, P.P. (2007). Phosphorylation of the atypical kinesin Costal2 by the kinase Fused induces the partial disassembly of the Smoothed-Fused-Costal2-Cubitus interruptus complex in Hedgehog signalling. *Development* *134*, 3677-3689.
- Shi, Q., Li, S., Jia, J., and Jiang, J. (2011). The Hedgehog-induced Smoothed conformational switch assembles a signaling complex that activates Fused by promoting its dimerization and phosphorylation. *Development* *138*, 4219-4231.
- Sisson, B.E., Ziegenhorn, S.L., and Holmgren, R.A. (2006). Regulation of Ci and Su(fu) nuclear import in Drosophila. *Developmental Biology* *294*, 258-270.
- Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K., and Scott, M.P. (1997). Costal2, a Novel Kinesin-Related Protein in the Hedgehog Signaling Pathway. *Cell* *90*, 235-245.
- Smelkinson, M.G., and Kalderon, D. (2006). Processing of the Drosophila Hedgehog Signaling Effector Ci-155 to the Repressor Ci-75 Is Mediated by Direct Binding to the SCF Component Slimb. *Current Biology* *16*, 110-116.

- Stegman, M.A., Vallance, J.E., Elangovan, G., Sosinski, J., Cheng, Y., and Robbins, D.J. (2000). Identification of a Tetrameric Hedgehog Signaling Complex. *J. Biol. Chem.* 275, 21809-21812.
- Vervoort, M., Crozatier, M.I., Valle, D., and Vincent, A. (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Current Biology* 9, 632-639.
- Wang, Q.T., and Holmgren, R.A. (1999). The subcellular localization and activity of *Drosophila cubitus interruptus* are regulated at multiple levels. *Development* 126, 5097-5106.
- Wang, Y., and Price, M.A. (2008). A unique protection signal in *Cubitus interruptus* prevents its complete proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 28, 5555-5568.
- Yang, W.Y., Larios, E., and Gruebele, M. (2003). On the extended beta-conformation propensity of polypeptides at high temperature. *J Am Chem Soc* 125, 16220-16227.
- Zhang, D., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2011). A novel immunity system for bacterial nucleic acid degrading toxins and its recruitment in various eukaryotic and DNA viral systems. *Nucleic Acids Research* 39, 4532-4552.
- Zhao, Y., Tong, C., and Jiang, J. (2007). Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* 450, 252-258.

## 2. Résultats supplémentaires concernant SUFU

### a. Analyse de la séquence de SUFU :

Un Alignement de séquences multiples sélectionnées par la méthode Blast et réalisé par le programme t-coffee avec les séquences de SUFU provenant de différentes espèces a révélé l'existence de plusieurs motifs très conservés, dont H87WH89Y situé sur un brin  $\beta$ . La structure cristalline du domaine N terminal de SUFU humain montre que ce motif interagit avec plusieurs résidus voisins situés sur des boucles. Ces résidus en interaction avec ce motif sont identiques chez toutes les espèces de la drosophile jusqu'aux mammifères et très conservés chez les bactéries. Du fait de la présence de deux histidines proches dans la séquence et dans la structure, nous avons pensé que ce site pouvait éventuellement fixer des ligands. Nous avons cherché à déterminer si un arrangement similaire de résidus existait dans d'autres structures de protéines. Nous avons soumis le site composé des deux histidines et de quatre résidus voisins dans la structure au programme ASSAM qui recherche dans la PDB des structures de protéines ayant des arrangements similaires de résidus. Cette recherche nous a permis d'obtenir une liste d'environ 20 structures stockées dans la PDB et dont la plupart correspondent à des sites de fixation de ligands (Figure 40). Les différentes structures obtenues montrent que ce motif est nécessaire à la fixation de cations comme Fe ou le Mg.

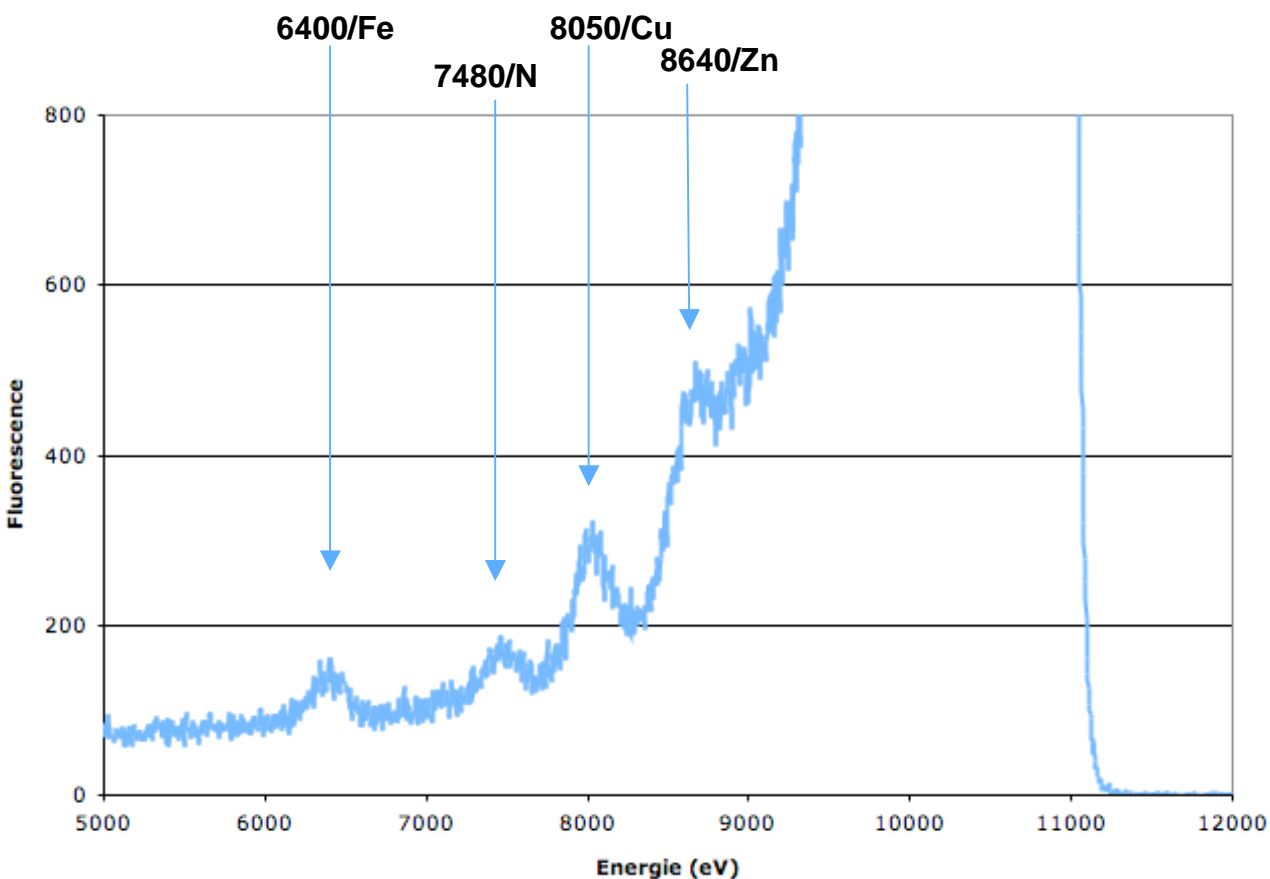


**Figure 40 : Structures de différentes protéines contenant un arrangement similaire à celui de SUFU autour des histidines 87 et 89 retrouvées par le programme ASSAM.** (A) Agrandissement du site de fixation du Fer dans la structure de la metalloenzyme : la phosphatase acide (1QHW) de rat. (B) Agrandissement du site de fixation du Magnésium dans la structure de la galactarate déshydrogénase (1HPF) de *Oceanobacillus iheyensis*. (C) Agrandissement du site de fixation du Zinc et du Manganèse dans la structure de la DNA polymérase PolC (3F2D) de *Geobacillus kaustophilus*. La structure de SUFU est représentée en vert et les résidus des structures identifiées par ASSAM en gris, rose ou orange, pour 1QHW, 1HPF et 3F2D, respectivement. Les cations sont représentés en sphères.

L'analyse de séquence de SUFU a permis de mettre en évidence des résidus très conservés et accessibles qui sont totalement conservés chez SUFU ainsi qu'un nouveau motif, le H87WH89Y, potentiellement responsable de la fixation des cations. La fixation de ces cations sur SUFU pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activation de SUFU ou sur son interaction avec Cl.

**b. SUFU fixe les cations :**

Le motif HWHY peut donc être impliqué dans la fixation des cations comme le Fe, Zn et Mg. La structure du domaine N-terminal de SUFU humaine ne présente pas de cation dans ce site. Afin de vérifier si notre SUFU, obtenue après expression dans les bactéries, est purifiée en complexe avec des cations, nous avons réalisé un test de fluorescence sur la ligne PROXIMA1 au Synchrotron Soleil. En effet, notre protéine purifiée dans le tampon : Tris pH8 10 mM, NaCl 150 mM et  $\beta$ -mercaptoéthanol et à une concentration de 5 mg/mL, est chargée dans une boucle et placée dans un faisceau de rayons X d'énergie 10 keV. L'échantillon est alors excité par cette lumière et le détecteur va permettre de collecter la fluorescence émise à différentes énergies au-dessous de l'énergie d'excitation. Le spectre obtenu après soustraction de l'effet du tampon est représenté dans la figure 41 :



**Figure 41 : Spectre de Fluorescence de SUFU obtenu sur la ligne PROXIMA1 au Synchrotron Soleil.** Le spectre affiché est la soustraction entre le spectre du tampon et le spectre de SUFU. Les différents pics obtenus sont indiqués avec leur énergie en keV et le nom de l'atome concerné.

Comme le montre le spectre, plusieurs pics à des énergies différentes sont visibles. En effet, le premier pic observé a une énergie de 6.4 keV et correspondant à l'énergie de fluorescence du Fer. Le deuxième pic est celui du Nickel avec une énergie de 7.48 keV. Deux autres pics sont aussi présents à des énergies de 8.05 et 8.64 keV qui correspondent à un pic de Cuivre et un pic de Zinc respectivement. Ces pics montrent que ces cations sont fixés à la protéine SUFU purifiée.

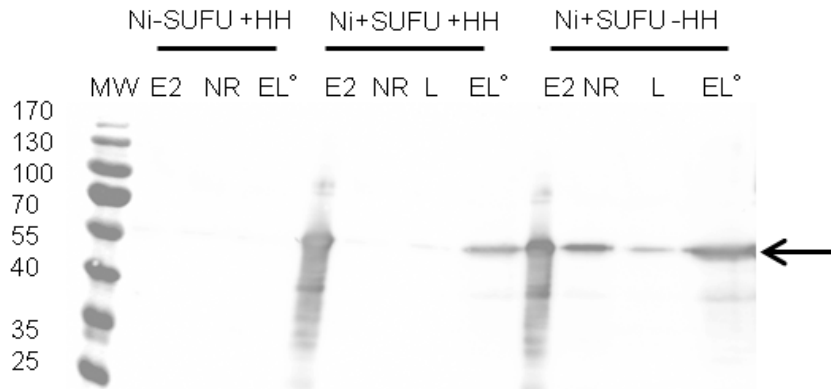
Ces résultats confirment l'affinité de SUFU pour les cations. Il faut tester si le motif HWHY identifié est responsable de la fixation de ces cations. Pour cela, les deux histidines H87 et H89 doivent être mutées et la même expérience sera refaite sur le double mutant et dans les mêmes conditions.

### c. Phosphorylation de SUFU :

#### ➤ *Par les extraits cellulaires :*

La protéine SUFU est très importante dans la régulation de la voie HH. Elle fait partie du complexe HTC qui permet la transduction des signaux extracellulaires et déclenche l'activation ou non de la voie. SUFU est une protéine centrale du complexe, puisqu'elle interagit avec CI et FU. Elle intervient directement au niveau des mécanismes de régulation du facteur de transcription en fonction de l'état d'activation de la voie. Cette régulation est assurée par des réactions de phosphorylation qui entraînent des changements d'activité biochimique et de localisation cellulaire. J'ai réussi à exprimer la protéine SUFU sous sa forme entière dans les bactéries mais cette expression ne permet pas les modifications post traductionnelles. J'ai alors mis en place un test qui permet de vérifier la phosphorylation de la protéine recombinante *in vitro* en utilisant la machinerie des cellules de drosophile. En effet, la protéine recombinante purifiée est fixée sur des billes de Nickel puis incubée avec le surnageant des extraits de cellules de drosophile (les cellules Kc) fournies par nos collaborateurs. La phosphorylation par deux types d'extraits cellulaires a été testée : des cellules où la voie HH n'est pas active et des cellules où la voie HH a été activée par incubation avec du milieu de culture contenant la protéine HH-N (voir partie Matériels et Méthodes). Après incubation avec les extraits, la protéine SUFU recombinante est récupérée par élution des billes de Nickel. Ces fractions d'élution contiennent un mélange de la protéine SUFU phosphorylée et non phosphorylée. Pour cela, la fraction phosphorylée est séparée et concentrée sur des colonnes de phosphoprotéines. Les fractions d'élution de cette colonne sont alors analysées sur gel d'acrylamide et par western blot avec les anticorps anti-SUFU. J'ai constaté que la fraction phosphorylée de SUFU est très faible, aucune bande supplémentaire n'est visible sur gel coloré par bleu de Coomassie après élution de la protéine des billes de Nickel. Les bandes de SUFU phosphorylée ne sont visibles que par western blot après élution de la colonne de phosphoprotéine (Figure 42).



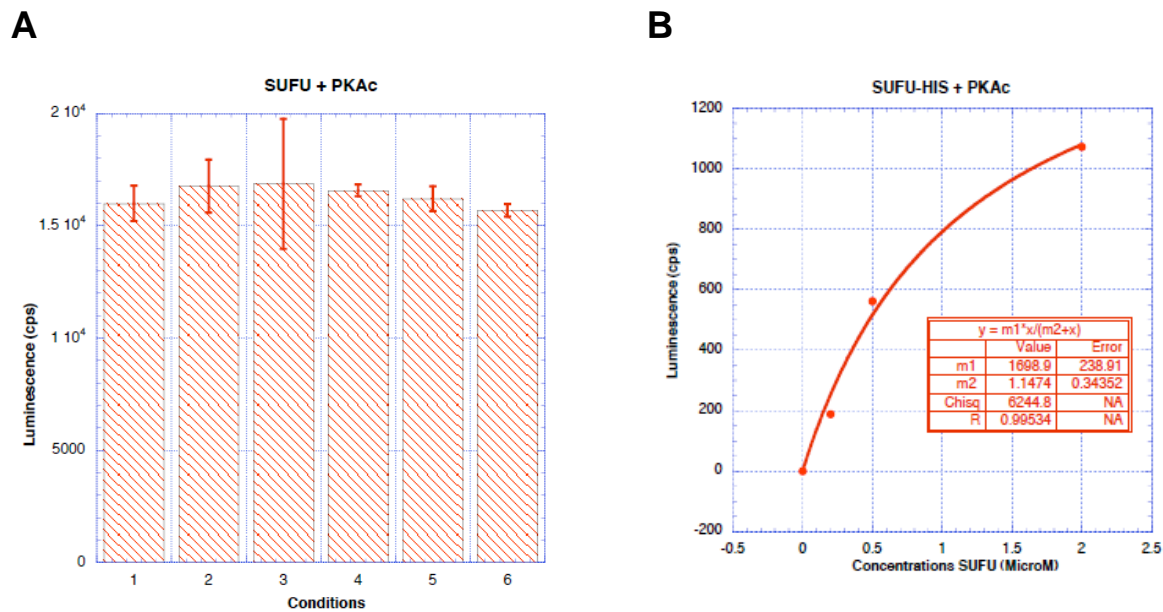


**Figure 42: Phosphorylation de la protéine SUFU recombinante avec des extraits de cellules de drosophile.** La protéine est fixée sur des billes des Nickel puis incubée avec les extraits où la voie HH a été activée ou non. Les bandes sont révélées par western blot avec des anticorps anti-SUFU (Dilution: 1/200; exposition: 10 sec). MW: Marqueurs moléculaires; Ni-SUFU+HH: résine sans SUFU avec les extraits HH activée; Ni+SUFU+HH: Résine avec SUFU et extrait HH activée; Ni+SUFU-HH: résine avec SUFU avec les extraits HH activée; E2: fraction initiale avant dépôt sur colonne; NR: Non retenu de la colonne; L: lavage de la colonne; EL°: Elution de la colonne de phosphoprotéines; Bi: Billes de la colonne.

Le blot révèle des bandes de SUFU dans les fractions d'élution de la colonne de phosphoprotéines, indiquant qu'une partie de la protéine a été phosphorylée au contact des kinases présentes dans les extraits cellulaires. Nous constatons aussi que la protéine est phosphorylée par les extraits cellulaires activés ou non. En revanche, nous remarquons des différences entre l'effet des cellules activées ou non. Après incubation avec les extraits où la voie HH n'a pas été activée, nous constatons la présence de bandes dans le non retenu de la colonne et dans les lavages. Ceci suggère que la protéine n'est pas totalement phosphorylée quand la voie HH n'est pas activée ou que SUFU est différemment phosphorylée en fonction de l'activation ou non de la voie. Nous avons ainsi pu montrer que SUFU est phosphorylée par les extraits cellulaires *in vitro* et montre des états de phosphorylation différents en fonction de l'état d'activation de la voie Hedgehog. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu suffisamment de protéine pour effectuer des mesures de spectrométrie de masse afin de mieux caractériser les phosphorylations. Nos deux tentatives de reproduction de cette expérience n'ont pas abouti.

➤ **Par la PKA :**

Il a été montré que la protéine SUFU est l'un des substrats de la protéine kinase PKA et est phosphorylée sur les résidus 128, 243, 301, 305, 342 et 346 (Chen et al., 2011a; Merchant et al., 2004). Nous avons alors voulu tester la phosphorylation de SUFU par la PKA *in vitro*. Pour cela, j'ai mis en place un test basé sur l'utilisation d'une réaction couplée à la luciférase pour suivre la phosphorylation en luminescence (voir partie Matériels et Méthodes). J'ai dû optimiser les quantités de kinase, de substrat et d'ATP pour trouver les conditions optimales de phosphorylation. Finalement, les mesures ont été réalisées avec 50 nM de la sous-unité catalytique de la PKA en présence de 0.5  $\mu$ M d'ATP et avec des concentrations différentes de SUFU.



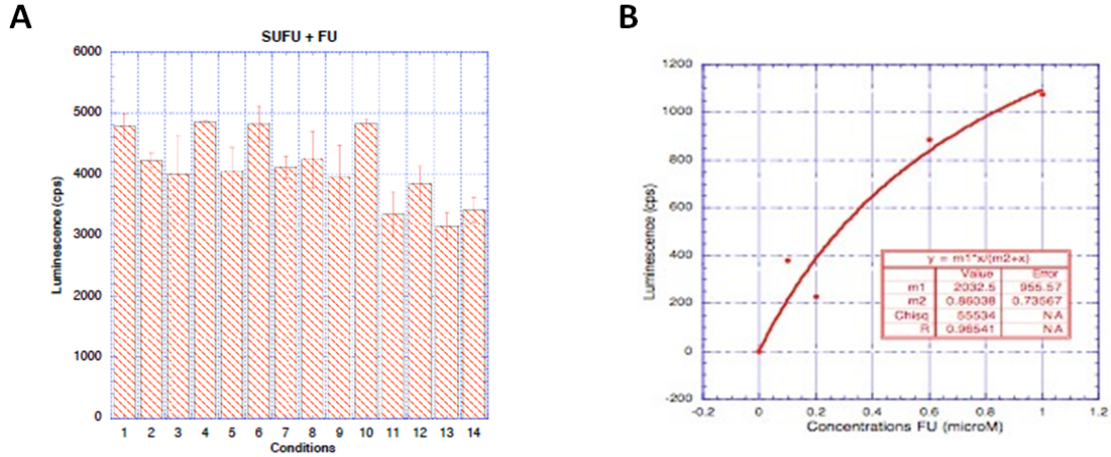
**Figure 43: Phosphorylation de SUFU par la PKA.** (A) Test en luminescence avec une réaction couplée à la luciférase. La réaction est réalisée avec 50 nM de PKA, 0.5 $\mu$ M ATP et des concentrations croissantes de SUFU. 1: ATP seul; 2: PKA seule; 3: SUFU seule à 2  $\mu$ M; 4: SUFU 200 nM+PKA; 5: SUFU 500 nM+PKA; 6: SUFU 2  $\mu$ M +PKA. (B) Test en luminescence avec une réaction couplée à la luciférase. Ajustement des données avec l'équation de Michaelis-Menten. La courbe montre que SUFU est phosphorylé par la PKA et l'équation nous donne une constante d'affinité de 1.14  $\mu$ M $\pm$  0.34  $\mu$ M.

La figure 43 A montre que la luminescence diminue quand SUFU est en présence de la PKA. Cette diminution de la luminescence reflète une augmentation de la consommation d'ATP. En effet, la PKA consomme de l'ATP pour phosphoryler SUFU, la quantité d'ATP résiduel diminue et la luminescence aussi. Ceci montre que SUFU est phosphorylée par la PKA *in vitro*. Nous

avons alors tracé la courbe de la luminescence en fonction de la concentration de SUFU et nous avons réussi à modéliser les données avec l'équation de Michaelis-Menten (Figure 43, B). Ainsi, la courbe montre que la consommation d'ATP augmente en fonction de la concentration de SUFU (Figure 43, B). Cette consommation suit le modèle de Michaelis-Menten avec une constante de Dissociation de  $1.14 \mu\text{M} \pm 0.34 \mu\text{M}$ . Nous n'avons pas réussi à atteindre la saturation, ce qui se traduit par l'absence de plateau. En effet, nous n'avons pas pu refaire les mesures avec des concentrations plus élevées de SUFU. La protéine montrait des problèmes d'agrégation à fortes concentrations avec ce test.

➤ **Par FUSED:**

Des études ont montré que SUFU est phosphorylée quand la voie HH est activée. Cette phosphorylation est perdue quand la protéine FU est mutée, ce qui suggère que cette protéine est directement ou indirectement impliquée dans la phosphorylation de SUFU. Afin de vérifier si FU phosphoryle directement SUFU *in vitro*, j'ai utilisé le même test couplé en luminescence que celui que nous avons utilisé pour mettre en évidence la phosphorylation de SUFU par la PKA. Les concentrations de SUFU et de FU ont été optimisées pour obtenir le meilleur signal. Nous n'avons pu obtenir un signal exploitable que lorsque nous avons fait varier la concentration de la kinase FU (avec comme contrôle la mesure de luminescence de FU sans substrat) comme le montre la figure 44 :



**Figure 44: Phosphorylation de SUFU par FUSED (GST-FU-1-328).** Test en luminescence avec une réaction couplée à la luciférase. (A) intensité de luminescence mesurée. La réaction est réalisée avec 1  $\mu\text{M}$  de SUFU, 50 nM ATP et des concentrations croissantes de FUSED. 1: ATP seul; 2: SUFU seule; 3: SUFU SUFU+FU 0.2  $\mu\text{M}$ ; 4: FU seule à 0.2  $\mu\text{M}$ ; 5: SUFU+ FU 0.3  $\mu\text{M}$ ; 6: FU seule à 0.3  $\mu\text{M}$ ; 7: SUFU+ FU 0.4  $\mu\text{M}$ ; 8: FU seule à 0.4  $\mu\text{M}$ ; 9: SUFU+ FU 0.5  $\mu\text{M}$ ; 10: FU seule à 0.5  $\mu\text{M}$ ; 11: SUFU+ FU 0.6  $\mu\text{M}$ ; 12: FU seule à 0.6  $\mu\text{M}$ ; 13: SUFU+ FU 1  $\mu\text{M}$ ; 14: FU seule à 1  $\mu\text{M}$ . (B) Valeurs de luminescence en fonction de la concentration de FU et ajustement des données avec l'équation de Michaelis-Menten.

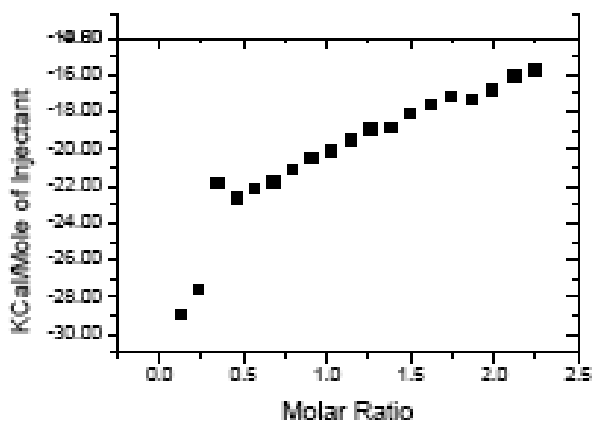
Les résultats montrent que la consommation d'ATP, qui se traduit par une diminution de la luminescence (Figure 44, A), augmente en fonction de la concentration de FU. Cette consommation est plus importante que dans les contrôles de FU seule pour chaque concentration. Ceci montre que le domaine kinase de FU phosphoryle SUFU *in vitro* et cette phosphorylation suit le modèle de Michaelis-Menten (Figure 44, B) avec une constante d'affinité de l'ordre de 1  $\mu\text{M}$ . Ces mesures doivent être refaites avec une concentration élevée de FU (1  $\mu\text{M}$ ) et en faisant varier les concentrations de SUFU. L'affinité entre la kinase FU et son substrat n'est pas très importante en solution mais nous avons réussi à montrer que FU pouvait phosphoryler SUFU *in vitro*.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la basse affinité entre FU et SUFU. D'une part, des études ont montré que dans la cellule, SUFU est en excès molaire par rapport aux autres protéines de la voie HH. La plus grande fraction de SUFU est cytoplasmique sous forme monomérique. L'autre fraction est associée au complexe Hedgehog (HTC) et a une localisation membranaire (Farzan et al., 2009). L'interaction entre FU et SUFU semble être favorisée par la présence des deux partenaires dans le même complexe. Le complexe stabilise l'interaction entre les deux protéines et améliore leur affinité dans les cellules. Ce qui peut expliquer la faible affinité entre les deux protéines obtenue par des mesures *in vitro* où il manque les autres partenaires pour

former le complexe. De plus, le domaine kinase de FU (1-328) semble avoir une plus faible affinité pour SUFU qu'une construction plus longue (Monnier et al., 2002). Ce qui pourrait aussi expliquer cette faible affinité entre les deux protéines *in vitro*. Les mesures doivent être refaites avec une construction plus longue de FU : 1-436 qui recouvre la totalité du domaine d'interaction avec SUFU.

#### d. Interaction FUSED-SUFU :

Nous avons réalisé des tests de calorimétrie (ITC) à l'IBBMC (Université Paris XI Orsay) afin de mettre en évidence l'interaction entre FU domaine kinase et la protéine SUFU. Les analyses ont été effectuées avec une concentration de 10  $\mu\text{M}$  de SUFU et 110  $\mu\text{M}$  du domaine kinase de FU en fusion à la GST dans le tampon : Tris-HCL 50mM pH8.5 ; NaCl 300mM ; Glycérol 10% ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; DTT 2 mM.



**Figure 45: Courbe de titration entre les protéines SUFU et FU kinase-GST (1-328) obtenue par ITC : Energie enregistrée en fonction du temps.** Courbe de la chaleur totale libérée en fonction de la concentration totale en FU calculée à partir de la courbe brute. L'expérience a été réalisée avec 20 injections de 2  $\mu\text{L}$  espacées de 180 sec et avec des concentrations de 10 et 110  $\mu\text{M}$  pour les protéines SUFU et FU respectivement.

Le thermogramme obtenu montre qu'il n'y a pas d'interaction entre les deux protéines (Figure 45). En effet, la chaleur libérée ne varie pas avec la concentration du ligand. Nous observons juste un effet de dilution dû à l'ajout de FU dans la cellule. L'interaction entre les deux protéines n'a pas pu être mise en évidence *in vitro*. Ceci confirme les résultats du groupe d'Anne Plessis qui ont montré par expérience en double hybride que le domaine suffisant pour une

interaction avec SUFU se situe entre les résidus 306 et 436, au-delà du domaine kinase de FU (Monnier et al., 2002), alors que notre construction se termine au résidu 328.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas d'interaction entre le domaine kinase de FU et SUFU, cependant, nous avons pu mettre en évidence la phosphorylation de SUFU par FU. Ceci montre qu'il ne s'agit probablement pas d'un complexe stable entre les deux protéines mais plutôt d'un complexe transitoire.

### **C. Caractérisation de la protéine MLF :**

Nous nous sommes intéressés à la caractérisation d'un nouveau membre de la voie HH, récemment identifié : la protéine MLF. Des études ont montré que cette protéine interagit avec la protéine SUFU et la protéine COS2 (Fouix et al., 2003), mais aucune donnée n'est disponible sur les mécanismes d'interaction de ces protéines ni sur le rôle joué par cette protéine dans la régulation de la voie. Nous avons alors essayé d'exprimer cette protéine sous sa forme entière dans les bactéries pour pouvoir la caractériser en solution.

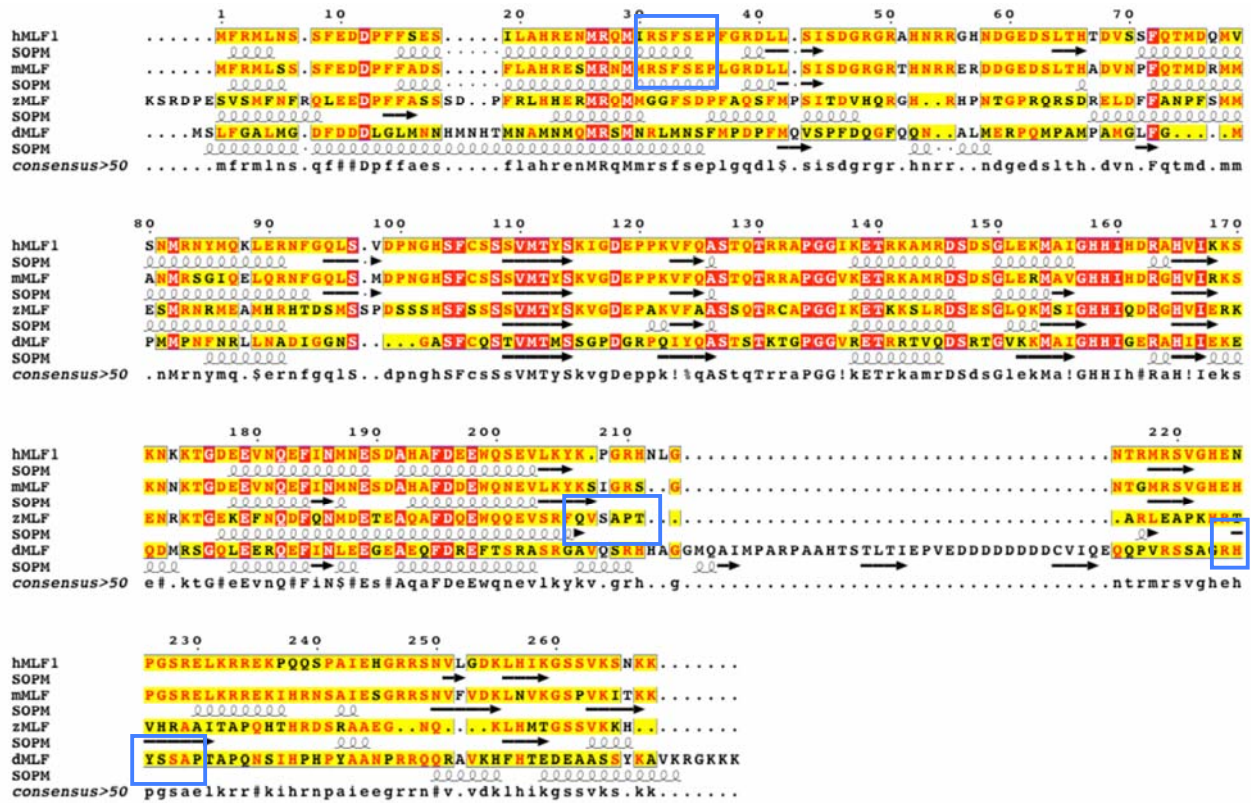
La protéine MLF en fusion avec la GST avec un site de coupure à la thrombine clonée dans le vecteur pGEX-2T (donné gracieusement par Anne Plessis) est exprimée dans la souche BL21 STAR à 19°C après une induction avec 0.2 mM IPTG sur la nuit. La protéine s'exprime bien, mais se dégrade rapidement. Après une analyse par spectrométrie de masse, nous avons constaté que notre protéine se clive en plusieurs morceaux au niveau de sa partie C-terminale. De plus la construction contient un site de coupure à la trombine et nous n'avons pas pu enlever la GST pour continuer la caractérisation de la protéine seule. Nous avons alors décidé de la recloner dans d'autres vecteurs d'expression.

## 1. Clonage et Expression :

Pour cela, nous avons commencé par cloner la protéine entière dans différents vecteurs d'expression du système Gateway. Nous avons alors réussi à obtenir notre protéine avec une étiquette 6-histidine en N-terminal et en fusion avec la Thioredoxine (THX) et la GST. Après un test d'expression dans la souche *Rosetta pLysS* à différentes températures, nous avons constaté que la protéine avec une étiquette histidine ne s'exprime pas et que les formes en fusion avec la THX ou la GST sont soit complètement insolubles soit se dégradent très rapidement. Nous avons donc décidé de tester des constructions plus courtes.

## 2. Analyse de la séquence de MLF et définition de nouveaux domaines :

En se basant sur un alignement multiple de différentes séquences de MLF disponibles dans Genbank (Figure 46) : MLF de drosophile (dMLF), MLF Humain (hMLF), MLF de souris (mMLF) et MLF du poisson zèbre (zMLF), nous avons pu constater la présence d'un domaine central très conservé dans les différentes espèces. Les prédictions de structure secondaire sont les mêmes pour toutes ces séquences (Figure 46), et ce domaine central en est particulièrement riche, pouvant indiquer que ce domaine pourrait être bien replié et contient le motif caractéristique d'interaction aux protéines de la famille 14-3-3 (voir introduction). Le domaine C-terminal de la protéine n'est pas très conservé entre les espèces et est prédit comme peu structuré du fait de la forte proportion d'acides aminés hydrophiles.



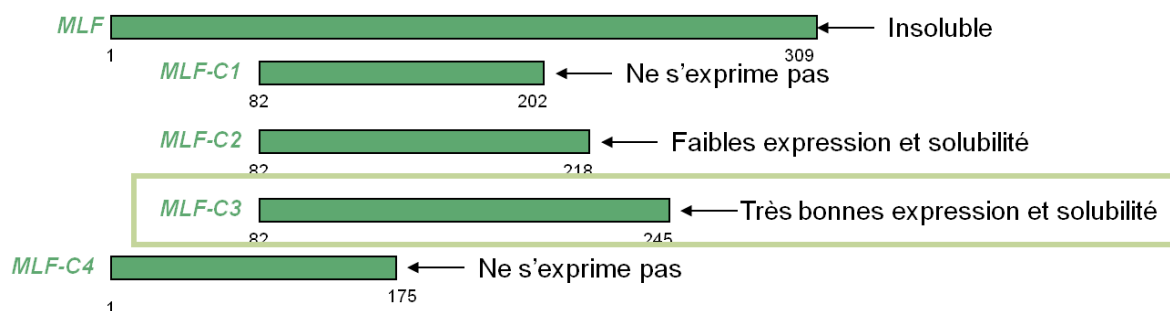
**Figure 46: Alignement de séquences de MLF entre les différentes espèces.** Alignement de séquences réalisé par les programmes ClustalW multiple alignment (Thompson et al., 1994) sur le site du Pôle Bioinformatique Lyonnais ([www.pbil.univ-lyon1.fr](http://www.pbil.univ-lyon1.fr)) et mis en forme par le programme ESPRIPT (Gouet et al., 1999) entre les séquences de MLF de drosophile (dMLF), MLF isoforme1 humain (hMLF1), de souris (mMLF) et de poisson zèbre (zMLF). La prédiction de structure secondaire a été réalisée avec le programme SOPM (Geourjon and Deleage, 1994). Cet alignement montre l'existence d'une grande conservation de séquences entre les espèces au niveau du domaine N-terminal et surtout du domaine central (entre les aa 80 et 200) de la protéine MLF. Les hélices  $\alpha$  sont représentées sous forme de spirales et les feuilletts  $\beta$  sous forme de flèches. Les motifs d'interaction à 14-3-3 pour chaque séquence sont encadrés en bleu.

Nous avons alors décidé d'exprimer plusieurs constructions de la protéine MLF de drosophile qui couvrent ce domaine central (MLF-C1 : aa82-aa202 ; MLF-C2 : aa82- aa218 ; MLF-C3 : aa82-aa245) et une construction qui couvre le domaine N-terminale de la protéine (MLF-C4 : aa1-aa175).



### 3. Clonage, Expression et purification des différentes constructions :

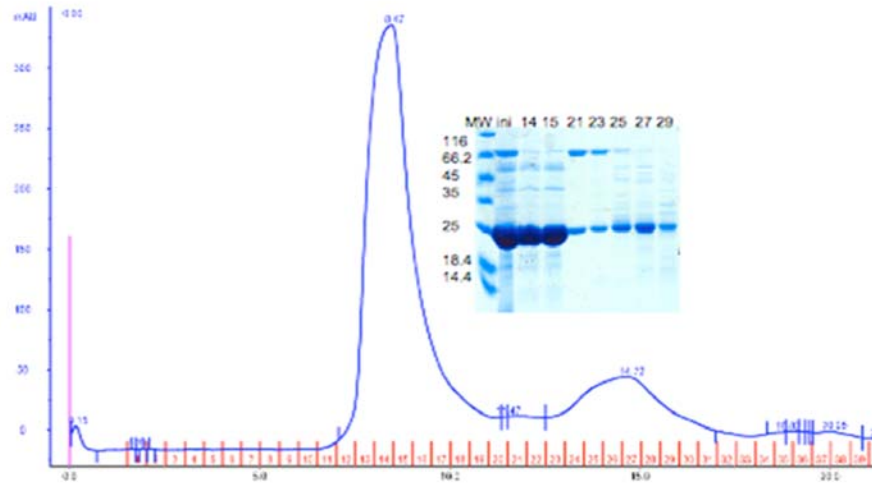
Ces constructions ont été clonées dans différents vecteurs d'expression Gateway. Après un test d'expression dans plusieurs souches bactériennes (*BL21 GOLD* et *Rosetta pLysS*) et à différentes températures d'induction (37°C, 28°C et 20°C) des constructions exprimées avec une étiquette 6-histidines, nous avons constaté que la construction C1 ne s'exprime pas et que la construction C4 est complètement insoluble. Les constructions C2 et C3 s'expriment bien dans la souche *Rosetta pLysS* à 20°C (Figure 47).



**Figure 47: Différentes constructions de la protéine MLF clonées par le système Gateway et exprimées en bactéries.** La protéine MLF exprimée sous sa forme entière est instable ou 100% insoluble. Nous avons alors essayé d'exprimer différentes constructions qui couvrent le domaine N-terminal et central de la protéine. La construction MLF-C3 montre la meilleure expression et solubilité. Nous avons par la suite caractérisé cette protéine.

Les constructions C2 et C3 ont été purifiées à partir d'un litre de culture en deux étapes : une première colonne d'affinité (HisTrap) suivie d'une colonne de tamis moléculaire. La construction C3 s'exprime très bien (plus que la construction C2) et est plus longue donc couvre plus le domaine central de protéine. Nous avons décidé de poursuivre la caractérisation de cette construction C3.

Les rendements obtenus après la première étape de purification (5mg de protéine /litre) montrent que la protéine est très bien exprimée, de manière soluble et se fixe bien à la colonne de Nickel. Après concentration de la fraction et passage sur une colonne de tamis moléculaire analytique (Superdex 200 10/300), nous pouvons voir deux pics sur le chromatogramme (Figure 48).



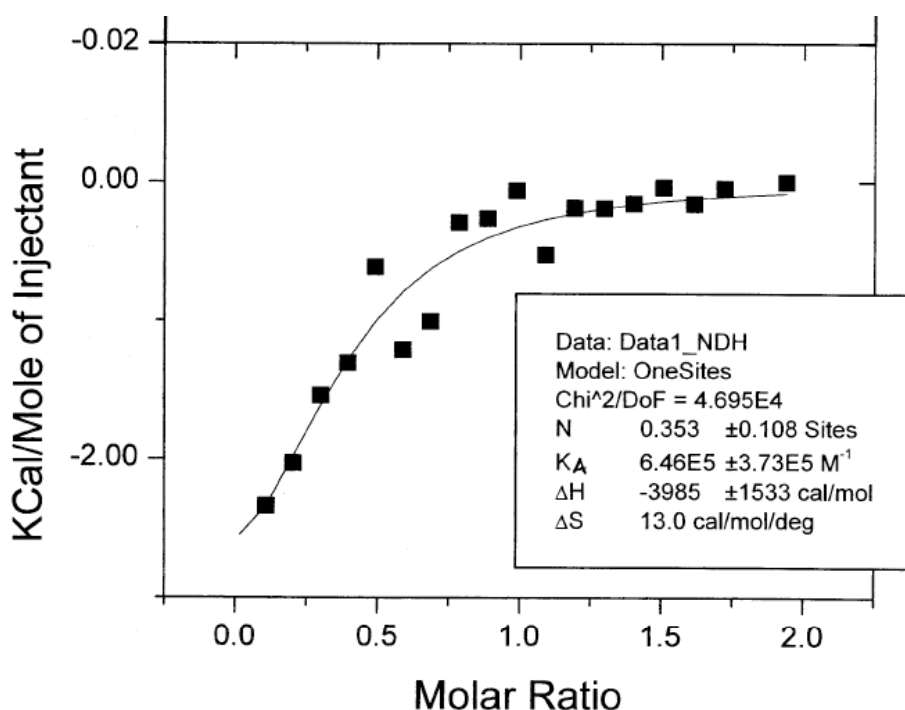
**Figure 48: Purification de la construction C3 de MLF: Profil d'élution sur une colonne Superdex 200 et analyse des différentes fractions sur Gel acrylamide.** Les fractions obtenues sont analysées sur gel acrylamide 12% : MW : Marqueurs de poids moléculaire ; Inj : échantillon de protéine injectée sur la colonne ; 14-29 : fractions d'élution de la colonne.

Un premier pic qui s'élue à un volume de 8.4 mL et un deuxième qui s'élue à un volume d'environ 15 mL (Figure 48). Les deux pics contiennent notre protéine avec une plus grande proportion dans le premier. Ces résultats montrent qu'une très grande partie de notre protéine agrège et forme des particules très grosses en solution. Une quantité relativement faible est donc bien repliée et s'élue comme une particule de masse apparente de 35 kDa. Sachant que notre construction fait 21 kDa, ce volume d'élution correspond probablement à un monomère avec une forme allongée de la protéine en solution. Les analyses sur SEC MALLS ont confirmé ces résultats et ont montré qu'il s'agit d'un équilibre entre les deux formes existantes dans les deux pics (non montré). Les masses exactes des différentes particules n'ont pas pu être identifiées en raison de cette agrégation. La construction C2 présentait le même problème d'agrégation.

Nous avons alors réussi à stabiliser et à obtenir plus de protéines C3 dans le deuxième pic de la colonne d'exclusion moléculaire, qui contient notre protéine non agrégée, en ajoutant dans notre tampon de purification dès la lyse du détergent  $\beta$ -OG (n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside) à 10 mM. Les rendements obtenus (1 mg de protéine /litre de culture) ont permis d'étudier l'interaction avec SUFU.

#### 4. Interaction MLF-SUFU :

Afin de mettre en évidence l'interaction entre les protéines SUFU et MLF, nous avons réalisé des mesures de calorimétrie (ITC). La protéine SUFU-His a été dialysée contre le tampon de purification de la construction C3 (Tris 10 mM pH8 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 5% ;  $\beta$ -OG 10 mM). La protéine MLF-C3 a été déposée dans la cellule à une concentration de 8  $\mu$ M et la titration a été réalisée avec la protéine SUFU à une concentration de 76  $\mu$ M et à température constante (20°C).



**Figure 49: Courbe de titration entre les protéines SUFU et MLF-C3 obtenue par ITC: Energie enregistrée en fonction du temps.** Courbe de la chaleur totale libérée en fonction de la concentration totale en SUFU calculée à partir de la courbe brute. Ce thermogramme montre une variation de la chaleur libérée qui augmente en fonction de la concentration de SUFU et l'ajustement mathématique produit un  $K_d$  de  $1.55 \pm 0.83 \mu$ M.

Le thermogramme obtenu montre une augmentation de la chaleur libérée en fonction de l'augmentation de la concentration de SUFU dans la cuve jusqu'à arriver à saturation (Figure 49). Cette courbe a été par la suite intégrée et nous avons pu obtenir plusieurs paramètres thermodynamiques : la variation d'enthalpie de la liaison,  $\Delta H$  (kcal/mol); la variation de l'entropie,  $\Delta S$  (cal/mol/deg); la constante d'association,  $K_A$  (M<sup>-1</sup>) et la stœchiométrie

d'interaction (n) qui indique le nombre de sites de liaison par monomère de la protéine. Nous avons pu aussi déterminer d'autres paramètres thermodynamiques comme la variation d'énergie libre,  $\Delta G$  (kcal/mol) et la constante de Dissociation,  $K_d$  ( $\mu M$ ) qui peuvent être déduit à partir des relations suivantes:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

$$K_A = 1/K_d \Rightarrow K_d = 1/K_A \quad (2)$$

Le tableau suivant résume les différentes valeurs obtenues :

$K_A$ (M <sup>-1</sup> )	n	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol/deg)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_d$ ( $\mu M$ )	T $\Delta S$ (kcal/mol)
6.46 10 <sup>5</sup>	0.353	-3.98	13	-7.79	1.55± 0.8	3.81

**Tableau 13:** Paramètres thermodynamiques obtenus à partir de la courbe de titration.

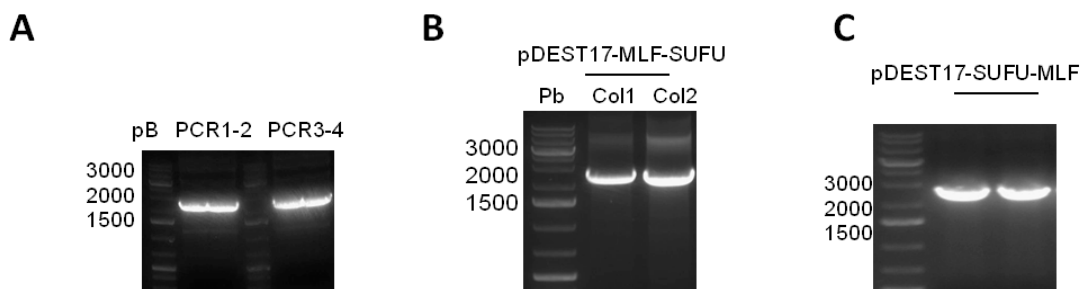
La variation de l'enthalpie ( $\Delta H$ ) nous renseigne sur la force de l'interaction entre les deux partenaires et plus particulièrement les interactions non covalentes comme les liaisons hydrogènes ou les interactions de Van de Waals. Dans notre cas, le  $\Delta H$  obtenu est négatif montrant une contribution favorable de l'enthalpie pour l'interaction. D'autre part, la mesure nous renseigne sur l'entropie du système (T $\Delta S$ ). Deux termes entropiques contribuent, d'une part, la fixation du ligand sur la protéine permet de chasser des molécules de solvant de la surface d'interaction. Il s'agit de l'entropie de Solvatation. D'autre part, cette fixation peut entraîner aussi des changements conformationnels de la protéine et va influencer son degré de liberté. Cette entropie est appelée : entropie de conformation. La valeur d'entropie obtenue par la mesure est la somme des deux entropies décrites. Dans le cas de SUFU et MLF, cette entropie est positive, indiquant que l'entropie a une contribution favorable dans le système. L'interaction entre SUFU et MLF est donc favorisée à la fois par l'enthalpie et l'entropie. La fixation des deux protéines s'accompagne de formation de liaisons non covalentes et de changements conformationnels. Ces deux valeurs vont nous permettre d'accéder à l'énergie libre de liaison ( $\Delta G$ ) à partir de l'équation (1). Ce paramètre nous renseigne sur l'affinité entre les deux partenaires. La valeur obtenue (-7.53 kcal/mol) montre qu'il s'agit d'une affinité modérée (Tableau 13). La valeur de la constante de dissociation obtenue par l'équation (2) confirme aussi que l'affinité entre les deux protéines n'est pas très forte (1.55  $\mu M$ ).

Enfin, la mesure nous permet d'accéder à la stœchiométrie du complexe formé à partir de la valeur de  $n$  (nombre de sites de liaison). En effet, le  $n$  obtenu par la mesure est de 0.35 ce qui se traduit par une stœchiométrie de 1:3. Donc le complexe se compose d'une molécule de SUFU pour 3 molécules de MLF. Nous avons ainsi validé les constructions de SUFU et MLF, qui sont structurées et interagissent entre elles en solution.

## **D. Coexpression des protéines MLF et SUFU :**

### **1. Clonage :**

Afin de mettre en évidence l'interaction entre les protéines SUFU et MLF et dans le but de purifier le complexe pour une étude structurale, nous avons co-exprimé les deux protéines à l'aide d'un même vecteur d'expression. En effet, les deux constructions sont clonées en série, ce qui permet aux deux protéines d'être traduites dans la bactérie en même temps. Seule une des deux protéines porte une étiquette en N-terminal pour faciliter la purification du complexe. Pour cela nous avons cloné les formes entières des deux protéines en deux constructions SUFU-MLF et MLF-SUFU pour tester la coexpression et l'interaction dans les deux cas. Nous avons commencé par amplifier les différents fragments d'ADN correspondants à chaque protéine avec les oligonucléotides correspondants (voir partie Matériels et méthodes). Les différents fragments sont ensuite hybridés deux par deux grâce au « linker » pour obtenir une cassette de clonage formée par les deux gènes à chaque fois en série. Cette cassette est par la suite amplifiée à son tour (Figure 50, A).

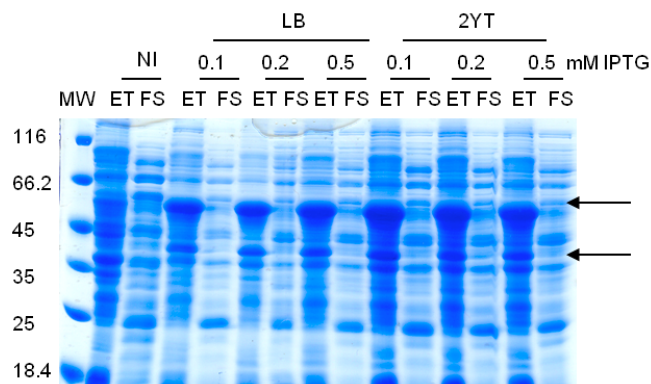


**Figure 50: Clonage pour coexpression des protéines SUFU et MLF.** (A) gel d’agarose 1% montrant les deux bandes d’amplification de la cassette contenant les deux gènes en série après hybridation. (B) Gel d’agarose 1% montrant deux clones positifs contenant la cassette clonée dans le vecteur pDEST17 de la construction MLF-SUFU. (C) Gel d’agarose 1% montrant deux clones positifs contenant la cassette clonée dans le vecteur pDEST17 de la construction SUFU-MLF. pB: marqueurs de poids moléculaire en paires de base; PCR 1-2: cassette contenant le gène de MLF suivie du gène de SUFU; PCR 3-4: cassette contenant le gène de SUFU suivie du gène de MLF; Col1: clone 1; Col2: Clone 2.

En effet, le gel d’agarose montre les deux fragments d’ADN obtenus après hybridations des inserts amplifiés séparément, les deux bandes correspondent au poids moléculaire attendu. Ces fragments ont été clonés avec succès dans le vecteur d’expression pDEST17 qui nous a permis d’obtenir les constructions suivantes : His-SUFU-MLF (Figure 50, B) et His-MLF-SUFU (Figure 50, C). La séquence nucléotidique a été confirmée par séquençage.

## 2. Expression :

Nous avons ensuite réalisé un test d’expression pour les deux constructions pour vérifier si les deux protéines s’exprimaient et pour déterminer les meilleures conditions de leur coexpression. Pour cela, nous avons testé l’expression (Figure 51) dans deux souches bactériennes d’*Escherichia coli* : *BL21 GOLD* et *Rosetta pLysS*, en variant la température d’induction (17, 20 et 25°C) et la concentration d’IPTG (0.1, 0.2 et 0.5 mM finale) et le milieu de culture LB ou 2YT (ce dernier étant plus riche en nutriments).



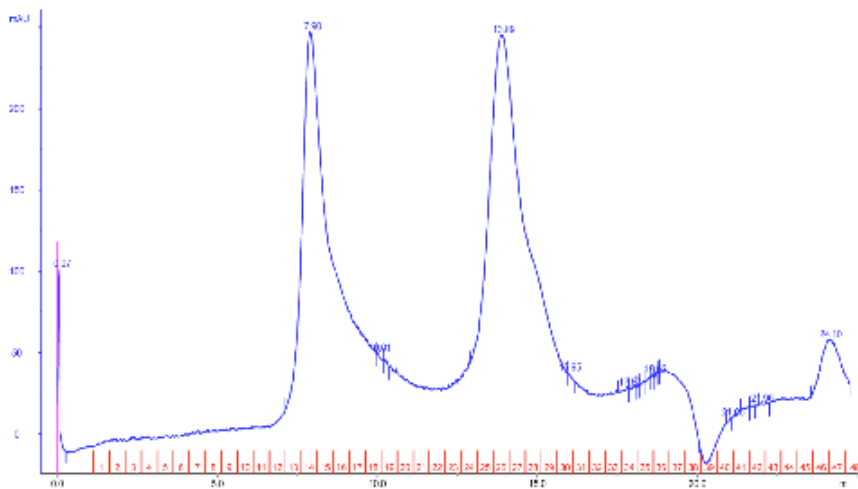
**Figure 51 : Test de coexpression des protéines SUFU et MLF avec la construction His-SUFU-MLF dans la souche *Rosetta pLysS* à 20°C pendant 5 heures.** Deux milieux de culture sont testés avec des concentrations variables d'IPTG. Les différents échantillons sont repris dans du bleu de charge et analysés sur gel d'acrylamide 12%.. MW : Marqueurs de poids moléculaire; ET : Extrait total ; FS : Fraction soluble. NI : non induit

Les résultats obtenus montrent que la construction His-MLF-SUFU ne s'exprime pas. Nous ne voyons pas de bandes de surexpression des deux protéines sur gel (non montré). Ceci est comparable au problème rencontré lors de l'expression de la construction His-MLF qui ne s'exprime pas. La construction His-SUFU-MLF s'exprime bien (Figure 51), nous pouvons voir la bande de surexpression de la protéine SUFU et une bande de surexpression de la protéine MLF qui est beaucoup moins intense. Les meilleurs rendements de coexpression ont été obtenus à 20°C dans la souche *Rosetta pLysS* avec une concentration de 0.2 mM d'IPTG

### 3. Purification du complexe SUFU-MLF :

La construction His-SUFU-MLF a été par la suite purifiée à partir des culots de trois litres de culture réalisée dans les conditions déterminées par le test d'expression. Une première étape de purification sur une colonne de Nickel (HisTrap) nous permet de fixer notre protéine SUFU qui porte une étiquette 6-histidines. Si la protéine MLF interagit avec SUFU, cela va permettre de la sélectionner parmi les différentes protéines et elle sera éluée de la colonne en même temps que SUFU.

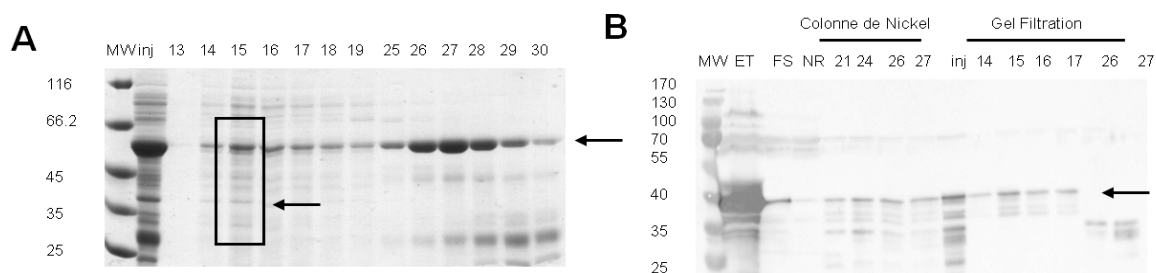
En effet, après analyse des différentes fractions d'élution de la colonne nous constatons que la protéine SUFU s'exprime bien et qu'elle se fixe bien sur la colonne. Dans ces mêmes fractions, nous pouvons identifier une bande correspondant au poids moléculaire de la protéine MLF. Cette étape nous a permis de montrer que la protéine MLF interagit avec SUFU puisqu'elle est co-éluee avec elle dans les mêmes fractions. Pour tester la stabilité du complexe et pour avoir une idée sur la force de l'affinité entre les deux protéines, nous avons concentré les différentes fractions d'élution contenant les deux protéines et injecté sur une colonne une colonne de tamis moléculaire (Superdex 200 10/300).



**Figure 52: Coexpression SUFU-MLF: Profil d'élution après une colonne Superdex 200 10/300.** Les différentes fractions d'élution de la première étape de purification sont concentrées puis injectées sur la colonne de tamis moléculaire. L'élution de la protéine est suivie sur le chromatogramme à 280 nm.

Le profil d'élution obtenu montre deux pics (Figure 52). Les différentes fractions d'élution correspondant aux deux pics ont été analysées sur gel (Figure 53, A) et par western blot (Figure 53, B) avec les anticorps spécifiques anti-MLF.





**Figure 53: Coexpression des protéines SUFU et MLF dans la souche Rosetta pLysS à 20°C.** (A) Analyse des différentes fractions d'élution de colonne (Superdex 200) sur gel d'acrylamide 12% coloré au bleu de Coomassie. (B) Analyse des fractions d'élution de colonne de nickel et de gel filtration avec un anticorps Anti MLF (Dilution: 1/20000; Exposition 30 sec). MW : Marqueurs de poids moléculaire ; Inj : échantillon de protéine injectée sur la colonne ; 13-30 : fractions d'élution de la colonne Superdex 200; ET : Extrait total ; FS : Fraction soluble; NR: non retenu de la colonne de Nickel; 21-27: fraction d'élution de la colonne de Nickel ; 14-27: fractions d'élution de la Superdex 200

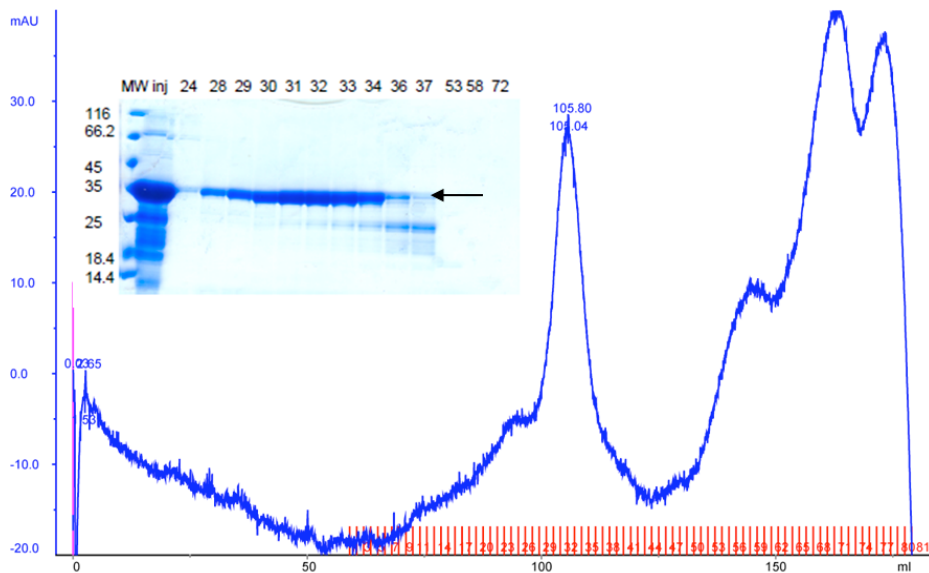
Les résultats obtenus montrent que la protéine MLF est bien co-exprimée avec SUFU, qu'elle se fixe grâce à son interaction avec cette dernière sur la colonne de Nickel et qu'elle s'élue avec SUFU (Figure 53, A) dans le premier pic de la colonne de tamis moléculaire comme le montre la chromatogramme de la Figure 51. Nous constatons l'absence de bandes révélée par l'anticorps anti-MLF dans les fractions 26 et 27 (Figure 53, B) correspondant aux fractions d'élution du pic de SUFU seule. La protéine MLF interagit donc directement avec la protéine SUFU. En effet, la protéine SUFU s'exprime mieux que MLF et de manière soluble. Nous constatons alors que la fraction soluble de MLF est entièrement en complexe avec SUFU. Cette interaction permet de stabiliser MLF et d'améliorer sa solubilité. Par la suite, nous avons constaté que le domaine central de MLF s'exprime mieux et de manière stable et qu'il est suffisant pour l'interaction avec SUFU. Une coexpression entre SUFU et la construction MLF-C3 pourrait améliorer les rendements du complexe et nous permettrait de pousser la caractérisation structurale de ce complexe.

## E. Autres protéines de la voie HH :

### 1. La partie C-terminale du récepteur Smoothened :

#### a. Expression-Purification:

La construction C-terminale de la partie cytoplasmique du récepteur SMO (aa 738-aa 1031) a été clonée dans le vecteur pET-30a avec une étiquette histidine en N-terminal (Construction donnée gracieusement par Laurent Ruel et Pascal Théron). Elle est produite dans la souche BL21 GOLD à 20°C pendant 5 heures en induisant avec une concentration finale de 0.5 mM IPTG. La purification est réalisée en deux étapes à partir de 3 litres de cultures : une colonne d'affinité Histrap et une colonne d'exclusion moléculaire Superdex 200 de 180 mL (Figure 54).



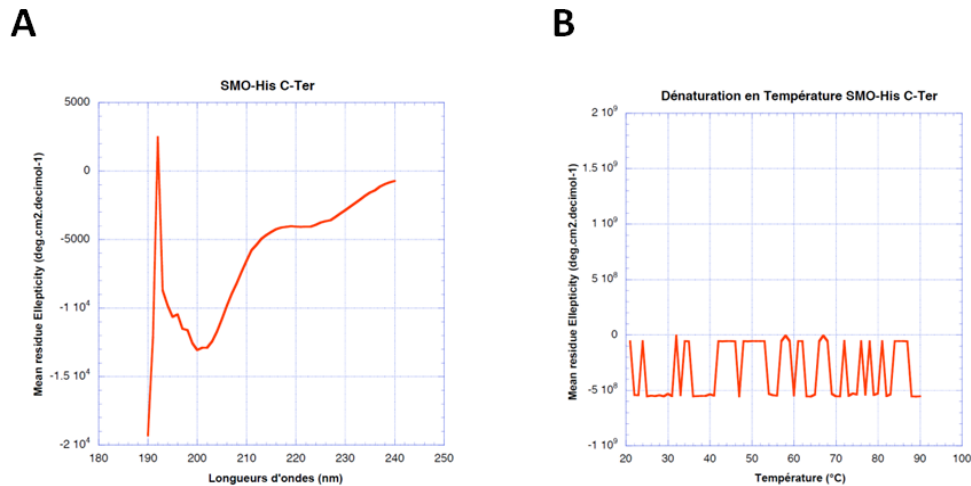
**Figure 54: Purification de la construction de SMO: Profil d'élution après une colonne de tamis moléculaire Superdex 200 et analyse des différentes fractions sur Gel acrylamide.** Les fractions obtenues sont analysées sur gel acrylamide 12% qui montre que la protéine a un poids moléculaire correspondant à celui attendu (35 kDa). MW : Marqueurs de poids moléculaire ; Inj : échantillon de protéine injectée sur la colonne ; 24-72 : fractions d'élution de la colonne.

La construction s'exprime très bien et sous forme soluble, nous pouvons voir une bande sur gel qui migre au même niveau que la bande à 35 kDa du marqueur de poids moléculaire. La figure montre que la protéine a un volume d'éluion de 105 mL et par comparaison avec la courbe d'étalonnage de la colonne, on constate que ce volume d'éluion correspond à un poids moléculaire d'environ 54 kDa. La masse théorique de ce domaine étant de 35 kDa, le poids apparent obtenu sur colonne montre qu'il s'agit probablement d'un monomère avec une forme très allongée en solution.

À la fin des deux étapes de purification nous avons obtenu une protéine pure à 95% avec un rendement de 2 mg de protéine /litre de culture.

**b. Caractérisation en solution:**

Des analyses en Dichroïsme circulaire ont été effectuées afin de réaliser une étude structurale préliminaire de la construction de SMO qui nous permet d'obtenir des informations sur sa structure secondaire et son repliement.



**Figure 55: Caractérisation de la construction de SMO par Dichroïsme Circulaire.** (A) Spectre de Dichroïsme circulaire : ellipticité moyenne par résidu en fonction de la longueur d'onde entre 190 et 240 nm. (B) Suivi du signal CD en fonction de la température: ellipticité moyenne par résidu entre 10 et 90°C. La protéine est dialysée dans le tampon phosphate pH 7.5 (50 mM) et Fluorure de sodium (50 mM). Les spectres obtenus montrent qu'il s'agit d'une protéine mal repliée dont le dichroïsme circulaire ne change pas avec la température.

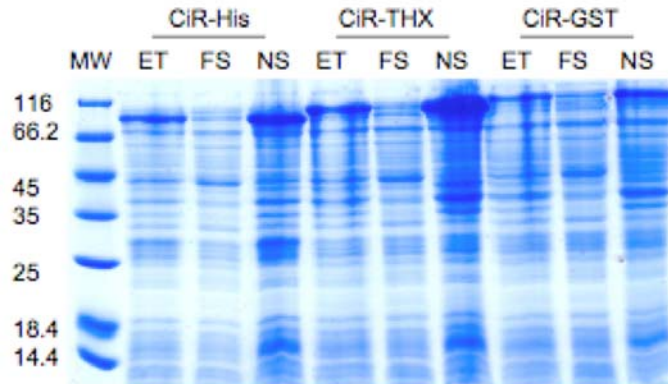
Le spectre de Dichroïsme circulaire entre 190 et 240 nm montre alors qu'il s'agit d'une protéine complètement non repliée (Figure 55, A). Ceci a été confirmé par le suivi de dénaturation thermique qui ne montre pas de changement de CD et donc de température de dénaturation (Figure 55, B). Ces résultats ont été confirmés aussi par une analyse en "Thermofluor" sur la plateforme CTPF (ICSN, Imagif) qui consiste à suivre la dénaturation thermique d'une protéine par la fluorescence d'un fluorophore qui augmente lorsque l'exposition de résidus hydrophobes augmente avec le dépliement de la protéine avec la température. Cette technique montre aussi qu'il s'agit d'une protéine mal repliée.

En effet, cette construction a été réalisée pour générer des anticorps dirigés contre le domaine C-terminal de SMO. Elle est très efficace pour l'obtention d'anticorps spécifiques, mais il est nécessaire de tester des constructions plus longues de ce domaine cytoplasmique ou l'exprimer en complexe avec des partenaires pour une caractérisation structurale de SMO.

## **2. La Protéine CI sous sa forme répressive (CI-R) :**

### **a. Clonage-Expression:**

Nous nous sommes intéressés à la caractérisation du facteur de transcription CI pour mettre en évidence les interactions avec les protéines partenaires et comprendre les mécanismes qui régulent ces interactions. Nous avons exprimé en bactéries la protéine CI sous sa forme entière en fusion avec la GST. Malheureusement, cette construction s'exprime bien, mais la protéine est complètement insoluble. Nous avons alors essayé d'exprimer la forme répressive de ce facteur de transcription (CI-R : aa1-aa703). Pour cela un clonage Gateway a été réalisé à partir de la construction de CI entière. Nous avons testé trois vecteurs d'expression différents qui permettent de fusionner notre construction avec différentes étiquettes de purification : le vecteur pDEST17 pour obtenir une protéine avec une étiquette histidine et les vecteurs pGET20A et pGET30A qui permettent d'obtenir une protéine en fusion avec la Thioredoxine (THX) et la GST respectivement. Après obtention des constructions dans les vecteurs voulus et vérification des construits par séquençage, nous avons testé l'expression et la solubilité (Figure 56) des différentes constructions obtenues dans la souche BL21 GOLD à 20°C pendant 5 heures.

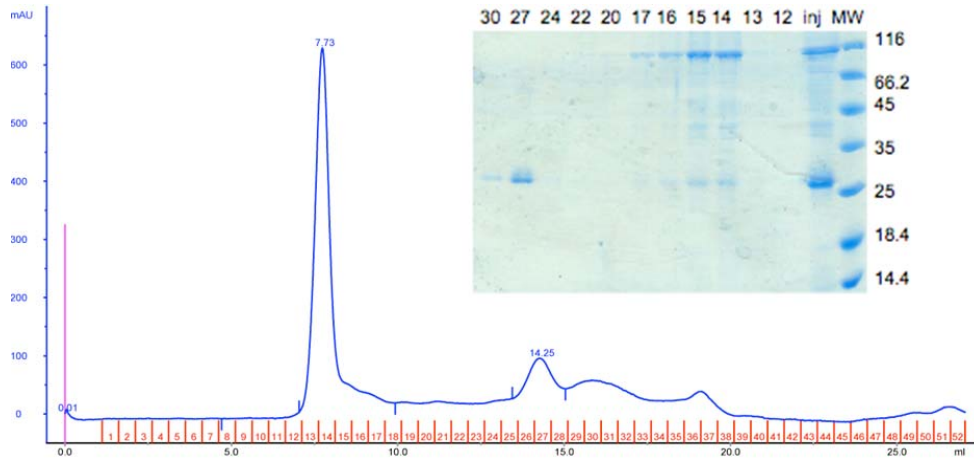


**Figure 56: Test d’expression de la construction de CI-R dans la souche *BL21 GOLD* à 20°C pendant 5 heures.** Après centrifugation pour récupérer la fraction soluble, les différents échantillons sont repris dans du bleu de charge et analysés sur gel d’acrylamide 12%. La protéine s’exprime très bien dans les trois conditions testées mais elle n’est soluble que lorsqu’elle est exprimée en fusion avec la GST. MW : Marqueurs de poids moléculaire; ET : Extrait total ; FS : Fraction soluble ; NS : Fraction non soluble (Culot).

Le gel obtenu montre que la protéine est exprimée dans les trois vecteurs dans la souche bactérienne (Figure 56). Cependant, nous ne voyons de bande correspondante au poids attendu que dans la fraction soluble de la protéine exprimée en fusion avec la GST. Cette construction s’exprime moins bien, mais montre une fraction soluble plus importante et moins de protéines dans la fraction non soluble. Nous avons alors décidé d’exprimer cette construction dans les conditions que nous avons déjà utilisées pour le test d’expression.

### **b. Purification:**

La protéine CI-R est purifiée à partir de culots de six litres de culture. Les rendements de purification ne sont pas très importants parce que la protéine est très instable en solution, elle se dégrade rapidement ce qui se traduit par l’apparition de plusieurs bandes de plus faibles poids moléculaires après la lyse et la première étape de purification (colonne d’affinité GSTrap, gel non montré). Nous avons alors effectué un test d’optimisation du tampon de lyse et nous avons opté pour un tampon qui favorise la stabilisation de la protéine et limite la dégradation (Tris 50 mM pH7.5 ; NaCl 200 mM ; Glycérol 10% ; EDTA 1 mM ; DTT 2 mM). La protéine est purifiée en deux étapes : une colonne d’affinité (GSTrap) et une colonne d’exclusion moléculaire (Superdex 200) (Figure 57). Ces deux étapes nous permettent d’obtenir une protéine pure à 95%.

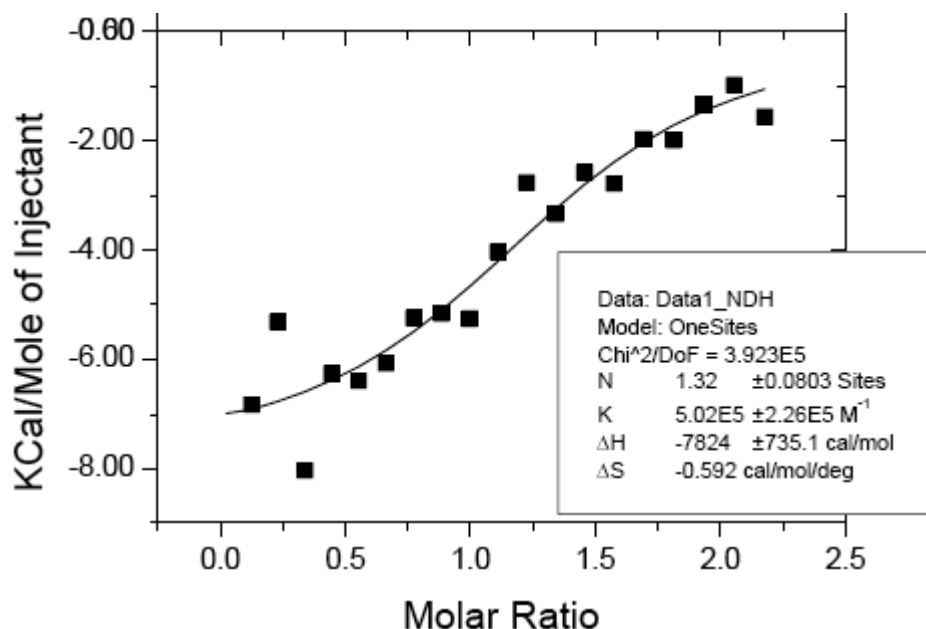


**Figure 57: Purification de la construction de CI-R en fusion avec la GST: Profil d'élution après une colonne Superdex 200 et analyse des différentes fractions sur Gel acrylamide.** Les différentes fractions d'élution de la première étape de purification sont concentrées puis injectées sur la colonne de tamis moléculaire. L'élution de la protéine est suivie sur le chromatogramme à 280 nm. Les fractions obtenues sont analysées sur gel acrylamide 12% : MW : Marqueurs de poids moléculaire ; Inj : échantillon de protéine injectée sur la colonne ; 13-30 : fractions d'élution de la colonne.

Le gel montre que la protéine a un poids moléculaire correspondant à celui attendu. Le chromatogramme montre que cette construction a un volume d'élution de 7.73 mL correspondant à une protéine de très hauts poids moléculaire qui s'élue presque dans le volume mort de la colonne (Figure 57). Cependant les rendements de purification sont très faibles et ne nous permettent d'obtenir que 0.5 mg/ml pour les six litres de culture.

### c. Interaction avec SUFU:

Afin de tester l'interaction entre CI-R et SUFU, nous avons réalisé des tests de calorimétrie isotherme (ITC) à l'IBBMC. Les analyses ont été effectuées avec une concentration de 12  $\mu$ M de SUFU et 127  $\mu$ M de CI-R dans le tampon : Phosphate 50 mM pH8.5 ; NaCl 150 mM ; Glycérol 10%.



**Figure 58 : Courbes de titration entre les protéines SUFU-His et CI-R-GST obtenue par ITC: Energie enregistrée en fonction du temps.** Courbe de la chaleur totale libérée en fonction de la concentration totale en CI-R calculée à partir de la courbe brute. L’expérience a été réalisée à 20°C avec 20 injections et avec des concentrations de 12.7 et 130 μM pour les protéines SUFU et CI-R respectivement. Ce thermogramme montre une interaction entre les deux protéines avec un  $K_d$  de  $2\pm 0.9\mu\text{M}$ .

Le thermogramme obtenu montre une augmentation de la chaleur libérée en fonction de l’augmentation de la concentration de CI-R dans la cuve jusqu’à arriver à saturation (Figure 58). Cette courbe a été par la suite intégrée et les différents paramètres thermodynamiques obtenus et calculés à partir des équations (1) et (2) sont résumés dans le tableau 14. Les paramètres thermodynamiques comme la variation d’énergie libre,  $\Delta G$  (kcal/mol) et la constante de Dissociation,  $K_d$  (μM) sont déduits à partir des relations suivantes:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

$$K_d = 1/K_A \quad (2)$$

$K_A$ (M <sup>-1</sup> )	n	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol/deg)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_d$ (μM)	T $\Delta S$ (kcal/mol)
$5.02 \cdot 10^5$	1.32	-7.82	-0.592	-7.65	2± 0.9	-0.173

**Tableau 14:** Paramètres thermodynamiques obtenus à partir de la courbe de titration.

Les résultats obtenus par calorimétrie nous ont permis de déterminer une constante d'affinité entre la protéine SUFU et la partie répressive de CI (CI-R) de l'ordre de 2  $\mu$ M. Il s'agit d'une faible affinité entre les deux protéines qui se traduit aussi par une valeur d'énergie libre ( $\Delta G$ ) modérée (-7.65 (kcal/mol)). Nous constatons aussi que l'interaction entre les deux protéines est caractérisée par une variation négative de l'entropie et de l'enthalpie. Ce qui montre que la fixation de CI-R sur SUFU est entièrement gouvernée par l'enthalpie et se traduit par la formation de liaisons non covalentes (de type liaison hydrogène) entre les deux partenaires. Dans ce cas, l'entropie est défavorable et la fixation des deux protéines n'induit pas de changements conformationnels très importants. Nous avons pu aussi déterminer la stœchiométrie du complexe donnée par le nombre  $n = 1.32$ . Si nous considérons que CI-R est dimérique artificiellement à cause de la fusion à la GST, ce nombre  $n$  de 1.32, proche de 1,5, se traduit par un dimère de CI-R pour une protéine SUFU. Ces résultats préliminaires montrent que SUFU et CI-R interagissent ensemble en solution avec une affinité modérée de 2  $\mu$ M. Ces mesures doivent être refaites après stabilisation de CI-R pour pouvoir éliminer la GST et déterminer la vraie stœchiométrie du complexe.

### **3. La Protéine COSTAL 2:**

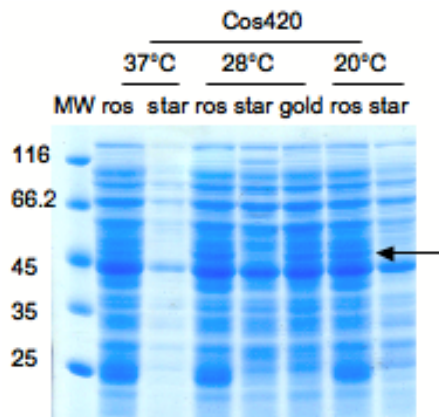
#### **a. Clonage-Expression du domaine Moteur de COS**

La protéine COS2 est la protéine d'échafaudage du complexe intracellulaire (HTC) de la voie HH. Il s'agit d'une kinésine indispensable pour l'activation de cette voie chez la drosophile. Peu d'études biochimiques ou moléculaires sont disponibles sur COS2. Les seules données concernent ses interactions avec les partenaires FU et SMO au sein du complexe. En effet, COS2 est phosphorylée en présence de FU, mais aucune étude n'a montré qu'il s'agit d'une phosphorylation directe. Une étude récente a permis de mettre en évidence sa fonction de kinésine dans les cellules. Les résultats ont montré que COS2 est capable de se déplacer sur les microtubules et qu'elle joue le rôle de protéine cargo pour certaines protéines de la voie HH comme CI.



## Résultats

L'expression de COS2 dans les cellules d'insectes (Sf21) ne nous a pas permis d'obtenir des rendements suffisants pour la caractériser *in vitro*. Nous avons alors essayé de l'exprimer sous sa forme entière dans les bactéries. Malheureusement, la protéine est complètement insoluble (donnée non montrée). Nous avons alors décidé d'exprimer le domaine moteur de cette kinésine avec la construction allant de l'acide aminé 1 à l'acide aminé 420. En effet, les domaines moteurs des kinésines sont connus pour être stables et bien repliés. La construction 1-420 a été clonée dans le vecteur Gateway pDEST17 avec une étiquette 6-Histidines en N-terminale. Nous avons alors transformé trois souches d'expression différentes : *Rosetta pLysS*, *BL21 GOLD* et *STAR* avec ce vecteur et nous avons réalisé un test d'expression à trois températures d'induction différentes : 37°C, 28°C et 20°C comme le montre la Figure 59.

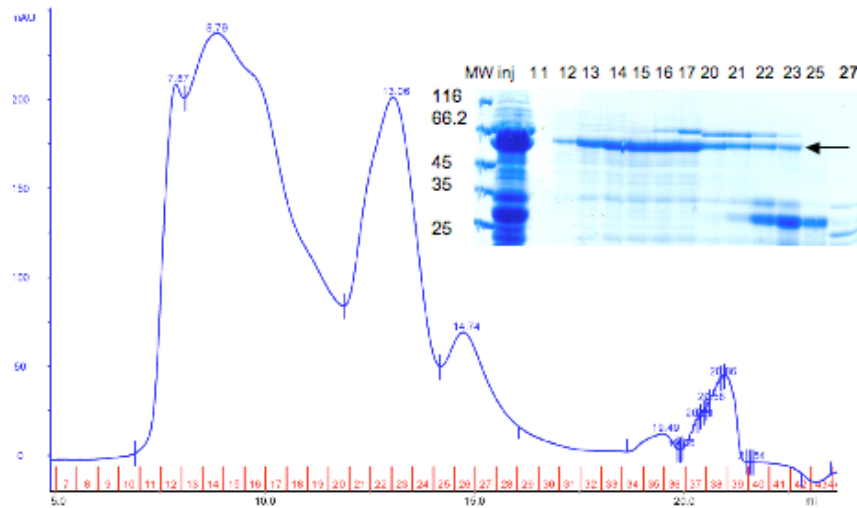


**Figure 59: Test d'expression du domaine Moteur de COS2 (aa 1-aa 420).** Trois souches différentes ont été testées : *Rosetta pLysS*, *BL21 GOLD* et *BL21 STAR* ainsi que trois température d'induction avec 0.5 mM IPTG: 37°C (pendant 4 heures), 28°C et 20°C (sur la nuit). Les échantillons sont repris dans du bleu de charge et analysés sur gel d'acrylamide 12%. Le gel montre les différentes fractions solubles après l'expression. MW : Marqueurs de poids moléculaire; ros : souche *Rosetta pLysS*; star : Souche *BL21 STAR*; gold : Souche *BL21 GOLD*.

En effet, le gel montre les fractions solubles après l'expression aux trois températures et dans les trois souches testées. La bande de surexpression de COS2 soluble qui migre au bon poids moléculaire (49 kDa) n'est visible que pour la souche *Rosetta pLysS* à 28°C et 20°C et dans la souche *BL21 GOLD* à 28°C. J'ai choisi d'exprimer la construction de COS2 dans la souche *Rosetta pLysS* à 20°C sur la nuit.

**b. Purification:**

La construction 1-420 de COS2 a été purifiée à partir des culots de 6 litres de culture en deux étapes : une première colonne d'affinité (HisTrap) suivie d'une colonne de tamis moléculaire contre le tampon (Tris 10 mM pH8 ; NaCl 100 mM ;  $\beta$ -Mercaptoéthanol 2 mM). La figure 60 montre le profil d'élution de la colonne Superdex 200 10-300.



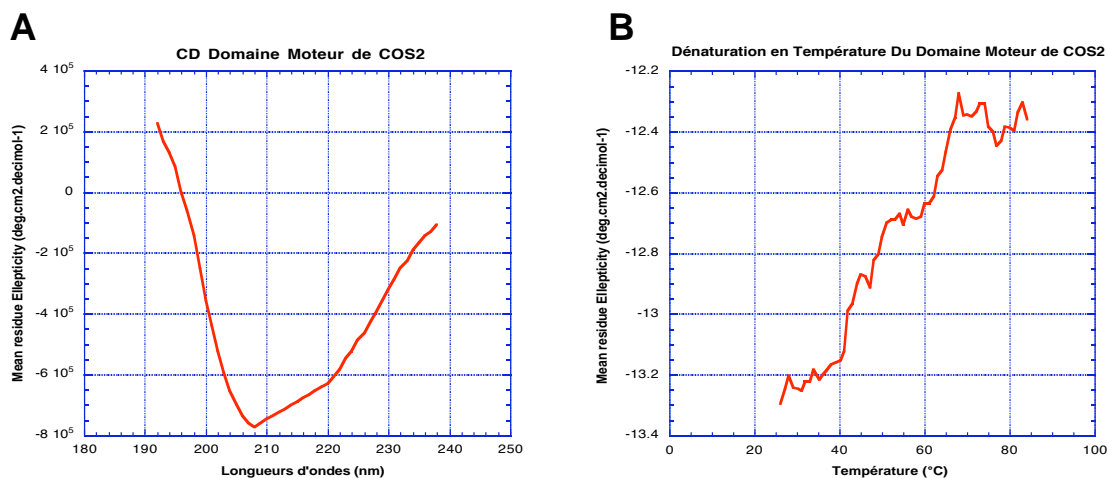
**Figure 60: Purification du domaine Moteur de COS2 (aa 1-aa 420) avec une étiquette 6-Histidines: Profil d'élution après une colonne Superdex 200 et analyse des différentes fractions sur Gel acrylamide.** Les fractions obtenues sont analysées sur gel acrylamide 12% : MW : Marqueurs de poids moléculaire ; Inj : échantillon de protéine injectée sur la colonne ; 11-27 : fractions d'élution de la colonne.

Le chromatogramme (Figure 60) montre que cette construction a un volume d'élution de 8.79 mL correspondant à une protéine de très haut poids moléculaire qui s'élue presque dans le volume mort de la colonne. Le gel montre qu'elle a un poids moléculaire correspondant à celui attendu (49 kDa). Le rendement de purification final est de 2 mg de protéine. Cette quantité nous ont permis de commencer la caractérisation de cette construction en solution.

**c. Caractérisation en solution par Dichroïsme Circulaire :**

Des analyses en CD ont été effectuées pour étudier la stabilité de la protéine et pour étudier sa composition en structure secondaire. La protéine a été dialysée contre du tampon

(phosphate pH 7.5 (50 mM) et Fluorure de sodium (50 mM)). Les spectres CD mesurés au laboratoire entre 190 et 240 nm et le suivi de la dénaturation en température mesurée entre 20 et 90°C sont montrés dans la Figure 61 :



**Figure 61: Caractérisation du domaine Moteur de COS2 par Dichroïsme Circulaire.** (A) Spectre de Dichroïsme circulaire : ellipticité moyenne par résidu en fonction de la longueur d'onde entre 190 et 240 nm. (B) Spectre de dénaturation en température de la protéine : ellipticité moyenne par résidu en fonction de la température entre 20 et 90°C. Les spectres obtenus montrent qu'il s'agit d'une protéine avec un spectre CD caractéristique d'un mélange d'hélice  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  avec une température de dénaturation de 50°C.

Le spectre CD obtenu pour la construction 1-420 de COS2 montre un profil similaire à une protéine riche en hélices  $\alpha$  et en feuillets (Figure 61, A). Après analyse de ces données sur le site Dichroweb et avec le programme SELCON, nous avons pu évaluer le contenu en structure secondaire de cette construction. En effet, elle est composée de 18% d'hélices  $\alpha$ , 26% feuillets  $\beta$  et 31% de désordre. Cette composition en structure secondaire est comparable à celle des domaines moteurs des kinésines disponible dans la Protein Data Bank.

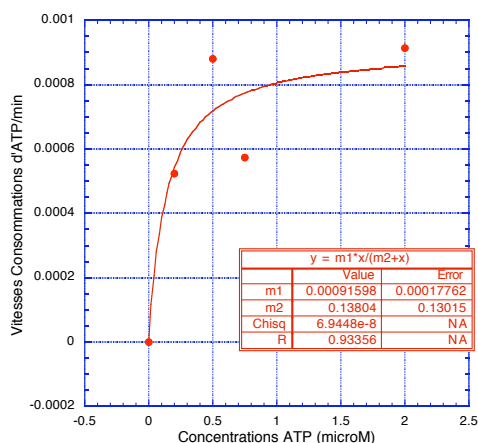
Le spectre de dénaturation obtenu (Figure 61, B) montre que la protéine commence à se dénaturer à partir des basses températures mais le graphe permet de déterminer une température de dénaturation d'environ de 50°C.

Ces résultats montrent que le domaine kinase de COS2 possède une composition en structure secondaire typique des domaines moteurs et qu'il possède une température de dénaturation de 50°C montrant qu'il s'agit d'un domaine assez stable qui commence à être dénaturé à basses températures.

**d. Activité ATPasique du domaine Moteur de COS2:**

Après purification du domaine moteur de COS2 et sa caractérisation par CD, nous avons voulu mettre en évidence la capacité de ce domaine à hydrolyser de l'ATP en absence de microtubules. Pour cela nous avons utilisé le test couplé à la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase qui permet de suivre en fonction du temps, la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm qui est proportionnelle à la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP. La consommation de l'ATP est suivie en fonction du temps (courbes non montrées). Différentes concentrations du domaine moteur ont été testées (0 ; 0.2 ; 0.5; 0.75 et 2  $\mu$ M) à une concentration fixe d'ATP de 2 mM. Les mesures ont été réalisées à 20°C.

À partir des pentes de ces courbes, nous avons pu déterminer la vitesse d'hydrolyse de l'ATP. Ces vitesses nous ont permis de tracer la courbe vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration d'ATP comme le montre la Figure 62 :



**Figure 62: Mise en évidence de l'activité d'hydrolyse d'ATP par le domaine moteur de COS2.** Les pentes des différentes courbes obtenues par absorbance à 340 nm en fonction du temps sont déterminées par ajustement linéaire puis utilisées pour tracer la courbe de la Vitesse en fonction de la concentration d'ATP. Cette courbe nous a permis de montrer que COS2 hydrolyse l'ATP. Cette consommation augmente en fonction de la concentration de COS2 et suit le modèle de Michaelis-Menten. Une constante d'affinité pour l'ATP de l'ordre de 138 nM a pu être déterminée.

Après ajustement des données avec l'équation de Michaelis-Menten, nous avons pu déterminer la constante d'affinité du domaine moteur de COS2 pour l'ATP qui est de l'ordre de 138 nM et la vitesse maximale d'hydrolyse qui est de  $9.1 \cdot 10^{-4}$  moles d'ATP/min (Figure 62). Ces résultats montrent que même en absence de microtubule, le domaine moteur de COS2 est actif et

capable d'hydrolyser l'ATP en solution. Cette expérience doit être refaite dans les mêmes conditions et en présence de microtubule pour comparer l'affinité pour l'ATP.

Les résultats préliminaires obtenus pour le domaine moteur de COS2 (Construction 1-420) montrent qu'il s'exprime bien dans les bactéries, qu'il est bien replié avec une structure secondaire riche en hélices  $\alpha$  et en feuillet  $\beta$  et qu'il est stable avec une température de dénaturation de 50°C. De plus, nous avons pu montrer que ce domaine possède une activité ATPasique en solution avec une bonne affinité pour l'ATP. Il faut maintenant continuer cette caractérisation en étudiant l'interaction avec les microtubules en présence et en absence d'ATP et de résoudre la structure tridimensionnelle de ce domaine pour obtenir des informations structurales nécessaires à la compréhension du rôle indispensable de COS2 dans la régulation de la voie HH.

### **III. Essais de cristallisation :**

Afin de compléter notre caractérisation structurale des différentes protéines cytoplasmiques de la voie HH, nous avons essayé de cristalliser différentes protéines et construction après optimisation de leurs conditions de purification. Pour certaines protéines comme le domaine kinase de FU ou le CI-R, les rendements de purification très faibles n'ont pas permis de lancer des essais de cristallisation. Pour les autres protéines exprimées, malheureusement ces essais n'ont pas abouti. Aucun essai de cristallisation testé n'a permis d'obtenir des cristaux malgré les différentes conditions de cristallisation testées : les différents kits, les différents additifs et les différentes concentrations. Pour certaines protéines comme pour le domaine C-terminal de SMO, les résultats obtenus en Thermofluore et en CD montrent que ce domaine n'est pas structuré ce qui explique l'échec des essais de cristallisation. Pour la construction du domaine central de MLF (MLF-C3), il s'agit d'un problème d'hétérogénéité de l'échantillon. En effet, il existe un équilibre entre la forme oligomérique de la protéine et la forme monomérique en solution. Ce mélange d'espèces perturbe l'équilibre et empêche la formation de cristaux. Pour la protéine SUFU, les essais de cristallisation n'ont pas abouti, ceci s'explique, comme le montrent les résultats de CD et de SAXS, par la présence de régions non structurées au début de la séquence (étiquette Histidine suivie d'une longue séquence intermédiaire) et dans le

domaine C-terminal de la protéine et par l'existence de ce long « linker » (80 acides aminés) entre les domaines de SUFU qui constitue une région très flexible empêchant la formation d'un réseau cristallin. Il est clair que pour pouvoir cristalliser les différentes protéines HH disponibles, il faut les stabiliser en solution. Pour pallier ce problème, la cristallisation des différentes protéines en complexe avec leurs partenaires semble être la solution pour pouvoir cristalliser les différentes protéines et résoudre leurs structures. Une alternative est d'exprimer d'autres constructions qui pourraient rendre plus stables les protéines isolées en solution. Le domaine moteur de COS2 s'exprime bien seul et de manière soluble. L'optimisation des conditions de sa purification pour améliorer sa stabilité en solution va nous permettre de lancer des essais de cristallisation qui nous permettront à court terme de résoudre sa structure tridimensionnelle.

## ***DISCUSSION***

## ***Discussion***

Mes travaux de thèse ont permis de caractériser différentes protéines du complexe intracellulaire de la voie HH. J'ai réussi à caractériser ces protéines en solution par des techniques biochimiques et biophysique après la mise au point des conditions de leurs conditions d'expression et de purification. Les résultats obtenus pour FU, SUFU et MLF seront discutés dans cette partie.

### **I. FUSED :**

Chez la drosophile, la protéine FUSED est indispensable à l'activation de la voie HH (Alves et al., 1998). Il s'agit d'une Sérine/Thréonine kinase capable de s'autophosphoryler et de phosphoryler ses substrats lorsque la voie HH est activée (Aikin et al., 2008). FU est activé par SMO et COS2 via une autophosphorylation de FU et une phosphorylation dépendante de la CKI (Zhou and Kalderon, 2011). La protéine s'accumule alors à la membrane cellulaire et joue son rôle de kinase en phosphorylant les protéines substrats.

FU est composé de deux domaines : un domaine catalytique N terminal (FU Kin) qui est très conservé et un domaine régulateur (FU Reg) qui permet l'interaction avec les protéines partenaires. Ces deux domaines sont capables d'interagir entre eux pour assurer la régulation de l'activité de la kinase en fonction de l'état d'activation de la voie HH (Ascano and Robbins, 2004).

Malgré l'importance de cette de protéine, aucune donnée moléculaire n'est disponible sur les mécanismes de son activation. Nous avons alors décidé de nous intéresser de plus près à cette protéine clé de la voie HH en la caractérisant *in vitro* par des méthodes biochimiques et biophysiques. Le premier défi à surmonter était de réussir à sur exprimer la protéine afin d'obtenir des quantités suffisantes pour mener à bien les essais *in vitro*. Pour cela nous avons commencé par tester l'expression de FU dans les cellules d'insectes qui semblaient être le système le plus adéquat pour exprimer une protéine de drosophile. J'ai constaté alors que la protéine est bien exprimée sous sa forme entière mais est sujette à une dégradation très importante avant même d'être purifiée. De plus les rendements de purification n'étaient pas suffisants pour permettre de la caractériser. En effet, la protéolyse de la protéine à l'intérieur de la cellule est probablement due à une régulation du temps de demi-vie afin de maintenir un niveau constant d'expression. Après purification, la protéine est très instable et agrège rapidement. Ces



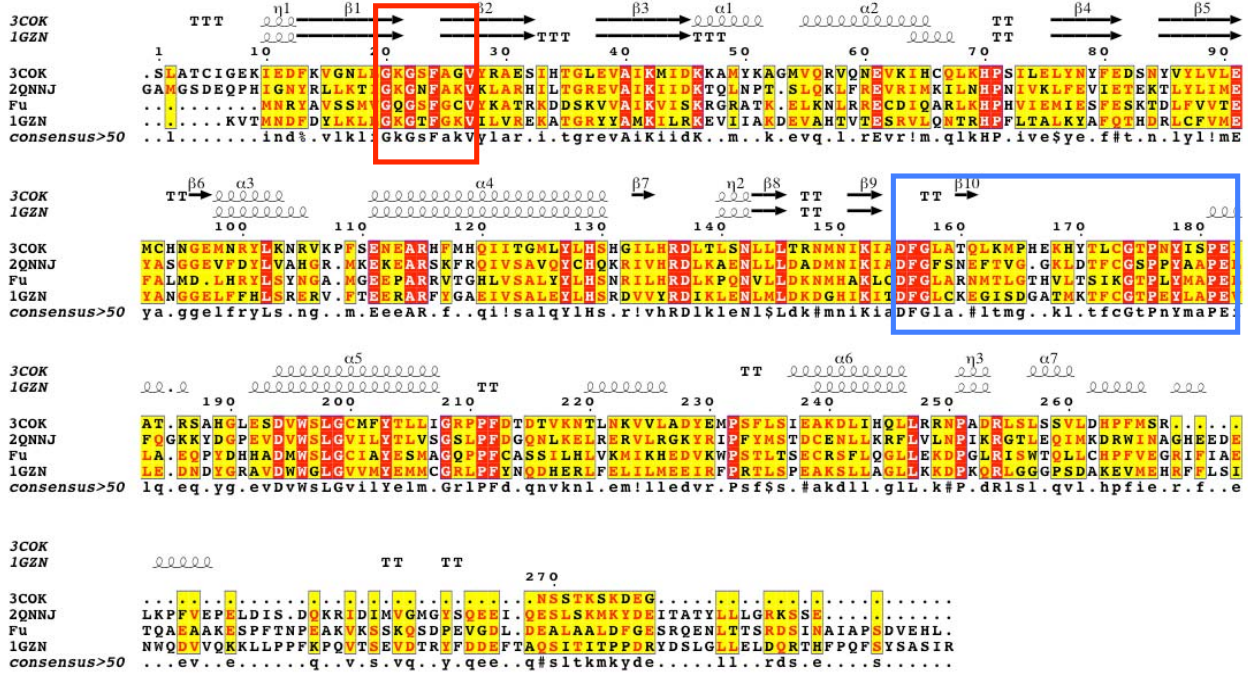
résultats suggèrent que la protéine FU ne doit pas se trouver seule dans la cellule, elle est probablement toujours en complexe avec ses partenaires ce qui la protège de la régulation par dégradation.

Nous avons alors décidé de changer de système d'expression et nous avons choisi le système bactérien pour produire la protéine FU sous sa forme entière ou ses deux domaines (kinase et régulateur) séparément. Malgré les différents vecteurs d'expression, de souches bactériennes et de protéines de fusion testées, la protéine entière et le domaine régulateur ne s'expriment pas ou sont complètement insolubles. Seul le domaine kinase s'exprime bien et de manière soluble dans les bactéries en fusion avec la GST. J'ai réussi à exprimer et à purifier le domaine kinase de la protéine FU, pour la première fois dans un système autre que les cellules d'insectes. Après optimisation des conditions de purification, nous avons pu caractériser la protéine en solution.

#### **A. Modélisation du domaine kinase de FUSED :**

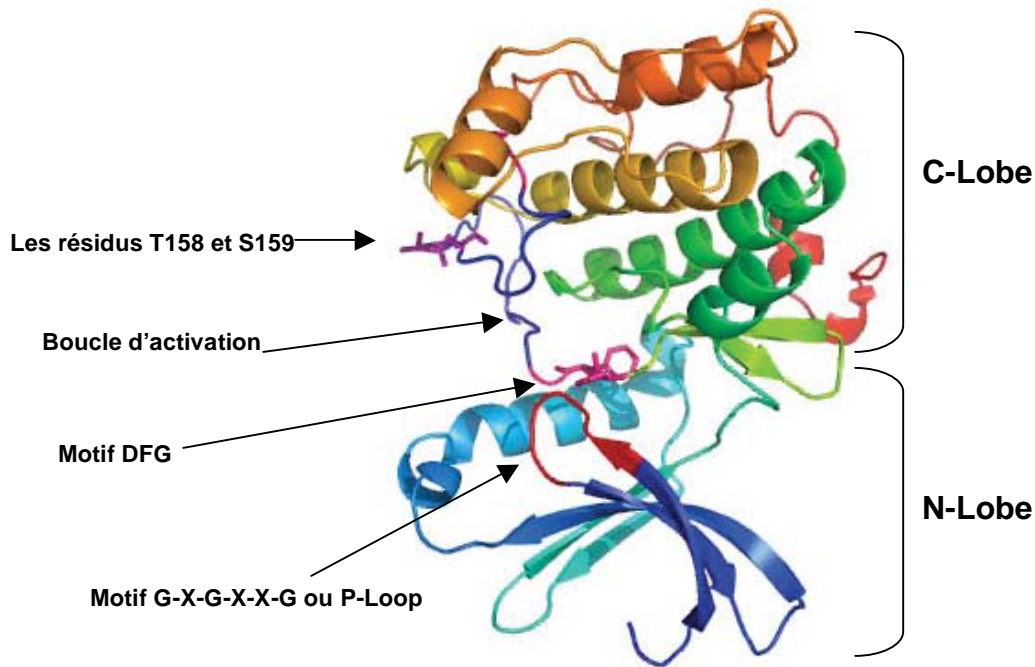
La protéine FUSED est une kinase atypique qui semble fonctionner de manière unique dans la voie de signalisation HH. Les alignements de séquences avec les séquences entières de kinases connues ne montrent aucune homologie avec le domaine C-terminal de FU qui est original, ce domaine ne montre pas de motif caractéristique pouvant nous renseigner sur sa fonction. Cependant, en réalisant une recherche de séquences homologues par le programme BLAST avec le domaine kinase de FU contre la PDB, nous avons pu constater une forte homologie de ce domaine avec différentes structures de domaines kinases disponibles. Nous avons pu alors modéliser le domaine kinase de FU et le superposer avec les différentes structures disponibles.

Les meilleures homologies structurales (30-33%) ont été obtenues avec trois kinases humaines qui montraient un très bon score : la Protéine kinase B (PKB), la Protéine kinase Polo 4 (Plk4) et la MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (Mark3PAR-1). Le meilleur score a été obtenu avec la Plk4. En effet comme le montre l'alignement de séquence avec ces trois kinases, le domaine kinase de FU présente tous les résidus identifiés comme importants dans la fonction de phosphorylation des Sérines/ Thréonines kinases (Figure 63).



**Figure 63: Alignement de séquence avec les structures secondaires observées pour les trois structures montrant une forte homologie avec le domaine kinase de FU.** Alignement de séquences réalisé par le programme ClustalW multiple alignment (Thompson et al., 1994) sur le site PBIL [www.pbil.univ-lyon1.fr](http://www.pbil.univ-lyon1.fr) et mis en forme par le programme ESPRIPT (Gouet et al., 1999) entre les séquences de FU, de la Plk4 (3COK), de la PKB (1GZN) et de la Mark3PAR1 (2QNJ). Cet alignement montre l'existence d'une grande conservation de séquences entre les espèces au niveau du domaine N-terminal et surtout du domaine central (entre les aa 80 et 200) de la protéine MLF. Les hélices  $\alpha$  sont représentées sous forme de spirales et les feuillet  $\beta$  sous forme de flèches. Le motif de fixation de l'ATP est identifié par le cadre rouge et la boucle d'activation par le cadre bleu.

L'alignement de séquence montre une forte homologie du domaine kinase de FUSED comparée à celle des domaines déjà cristallisés sur l'alignement. Le domaine kinase de FU montre un motif de fixation de l'ATP de type (G-X-G-X-X-G). Cette homologie nous a permis de modéliser la séquence du domaine kinase de FU par le programme Phyre comme le montre la figure 64.



**Figure 64: Modèle du domaine kinase de FUSED obtenu par le programme Phyre basé sur la structure de la Polo-kinase4 (PLK4) (code pdb 3COK).** La protéine est composée de deux lobes qui bougent l'un par rapport à l'autre pour ouvrir ou fermer la fente. La forme ouverte permet l'accès de l'ATP au site actif et la libération de l'ADP. Le N-lobe contient une boucle très riche en glycine qui fixe et oriente l'ATP, c'est le motif G-X-G-XX-G (coloré en rouge). Le C-Lobe contient la boucle d'activation (coloré en bleu) de toutes les protéines kinases qui commence par le motif DFG et se termine par APE. Les résidus T158 et S159 sont situés au niveau de la boucle d'activation (colorés en violet) modélisée par le programme car elle est absente dans la structure sur laquelle est basé le modèle.

En conclusion l'analyse de séquence de la protéine FU a montré que son domaine C-terminal est unique et ne peut pas être modélisé. En revanche, son domaine kinase montre une forte homologie avec des kinases connues, ce qui montre qu'il s'agit d'un domaine classique que nous avons pu modéliser. Le modèle obtenu nous a permis d'identifier les résidus importants pour sa fonction kinase en particulier le motif de fixation de l'ATP et sa boucle d'auto-activation.

## **B. Caractérisation de l'autophosphorylation du domaine kinase :**

### **1. Activité de la protéine FU sauvage :**

Par un test couplé à la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase (LDH/PK) j'ai pu montrer que le domaine kinase est capable d'hydrolyser l'ATP avec une vitesse maximale d'hydrolyse de  $3.92 \cdot 10^{-5}$  moles ATP/min. J'ai pu aussi déterminer une constante d'affinité pour l'ATP de l'ordre de 212  $\mu$ M. Ce qui montre que l'affinité est inférieure à celle d'autres kinases connues. Par exemple, la protéine kinase JNK1 $\beta$ 1 montre une constante d'affinité de l'ordre de 6  $\mu$ M pour l'ATP (Figuera-Losada and Lograsso, 2012).

### **2. Activité des mutants de FU :**

Plusieurs travaux ont décrit l'importance de différents résidus dans l'autophosphorylation de FU (Fukumoto et al., 2001). En effet, FU possède plusieurs sites d'autophosphorylation responsables de son activation : les résidus T151, S159 et S482 (Zhou and Kalderon, 2011) ainsi que le résidu T158 qui est décrit dans ces travaux récents comme site de phosphorylation par la CKI. J'ai obtenu les mutants FU S159A et le double mutant T158/S159A par mutagenèse dirigée sur le domaine kinase de FU. Après expression et purification de ces deux mutants dans les mêmes conditions que la protéine sauvage, j'ai testé leur capacité à s'autophosphoryler *in vitro* avec le même test couplé à la LDH/ PK. Les résultats obtenus montrent que les deux mutants sont capables aussi d'hydrolyser l'ATP en solution mais j'ai constaté que leur affinité pour l'ATP (1.5 mM) est diminuée par rapport à celle de la protéine sauvage. De plus les deux mutants semblent être moins stables que la protéine sauvage.

Nous avons pu montrer que le domaine kinase est capable d'hydrolyser l'ATP *in vitro* avec une affinité modérée. Cependant les mutants décrits comme inactivant FU montre toujours une activité en solution mais avec une diminution de leur affinité pour l'ATP. Cette faible affinité peut se traduire par une déstabilisation de la boucle d'activation qui change de conformation dans le site actif de la protéine à cause des mutations.

### 3. Mécanisme d'autophosphorylation :

Le mécanisme d'autophosphorylation de FU n'est pas encore élucidé. Il existe différentes hypothèses pouvant expliquer ce mécanisme. L'autophosphorylation de la protéine peut être due à un mécanisme intramoléculaire où la boucle d'activation va bouger jusqu'au site de fixation de l'ATP les résidus sérine et thréonine peuvent alors être phosphorylés. L'autophosphorylation peut se faire aussi de manière intermoléculaire où une autre molécule de FU viendrait phosphoryler ces résidus et activer la protéine. La troisième possibilité est que les résidus T158 et S159 soient phosphorylés par une autre kinase dans la cellule puisque cette hypothèse est impossible *in vitro*.

Il a été montré que FU est capable de dimériser dans la cellule (Ascano et al., 2002; Zhang et al., 2011) donc l'hypothèse d'un mécanisme d'activation intermoléculaire est possible. FU est probablement autophosphorylée par le domaine kinase de son partenaire dans le dimère. De plus l'hypothèse d'une activation par un mécanisme intramoléculaire est peu probable car elle nécessite une certaine flexibilité de la boucle d'activation et un mouvement important au sein du domaine kinase et même si cette hypothèse existe dans la littérature, la dimérisation de FU pourrait éliminer cette possibilité.

L'expression du domaine kinase seul favorise probablement l'obtention d'une forme active de la FU où tous les résidus susceptibles d'être phosphorylés sont exposés. Les résultats obtenus montrent que les deux mutants continuent à hydrolyser l'ATP *in vitro*, ce qui suggère que FU peut être autophosphorylée sur d'autres résidus.

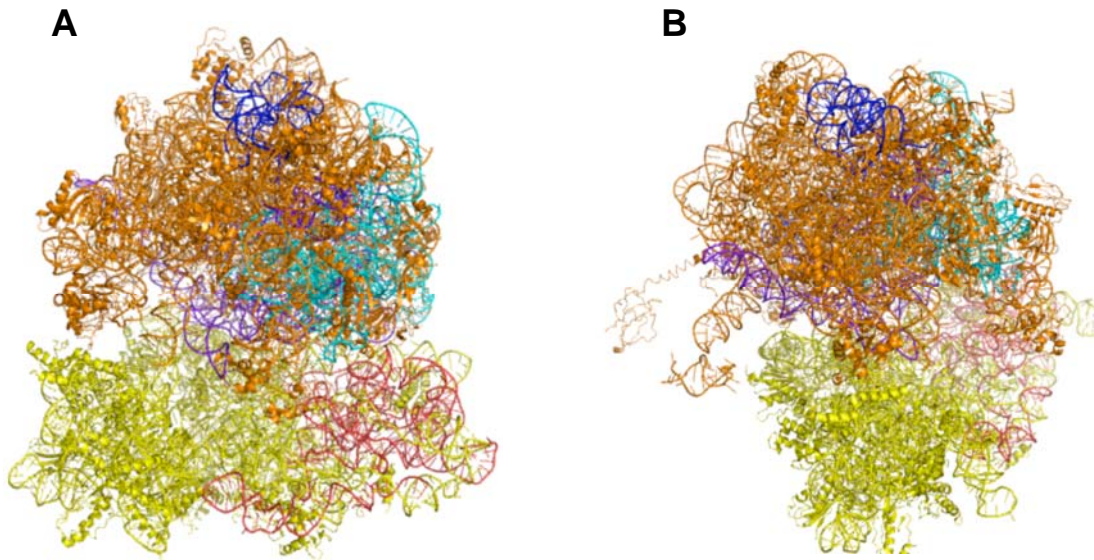
### 4. Le domaine kinase de FU fixe L'ARN :

Le domaine kinase de FUSED purifié présente une absorbance à 260 nm (caractéristique des acides nucléiques) plus importante que celle à 280 nm, ce qui est inhabituel pour une protéine. Nous avons alors pu mettre en évidence la fixation d'un acide nucléique sur la protéine et sa copurification pendant toutes les étapes. Nous avons pu montrer aussi que cet acide nucléique était de l'ARN par une série de digestions avec des enzymes spécifiques, qui ont montré que l'acide nucléique est totalement digéré par la RNase et la Benzonase et pas par la DNase. La fixation de l'ARN sur FU est dépendante de la présence du Magnésium dans le tampon de purification et la purification dans ces conditions agit directement sur l'activité

d'autophosphorylation de FU qui est diminuée par rapport à la protéine purifiée en absence de Magnésium.

Sur gel d'agarose, nous distinguons 2 bandes d'ARN de tailles différentes. Après isolation de cet ARN et son séquençage avec des amorces aléatoires, les résultats ont montré qu'il s'agirait de l'ARN ribosomal d'*E.coli* avec des séquences identifiées sur la sous-unité 16S (comme la 100-456) et sur la sous-unité 23S (comme les régions 1153-1482, 1741-2085 et 2475-2874). Ces résultats suggèrent que FU interagisse avec l'ARN ribosomal entier d'*E.coli*.

Quelques unes des régions d'ARN identifiées par séquençage ont été localisées sur la structure du ribosome entier d'*E.coli* (Figure 65) (Zhang et al., 2009).

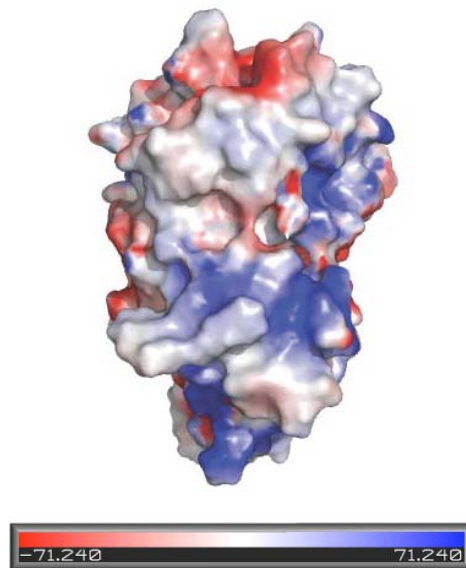


**Figure 65: Structure du Ribosome (3I1Q).** (A) La région d'interaction avec FU sur la sous-unité 16S est colorée en rouge. Les régions d'interaction avec la sous-unité 23S sont colorées en bleu, cyan et violet. (B) Vue à 180° de la structure du ribosome. Les régions de l'ARN 16S et 23S avec lesquelles le domaine de FU interagit se trouvent sur une seule face du ribosome et sont très accessibles.

La structure montre que les régions d'ARN séquencées sont situées sur une seule face du ribosome. Aucun article ne mentionne une implication possible d'un ARN dans la voie HH. A fortiori, l'affinité de FU pour les acides nucléiques n'a pas été rapportée. En effet, il est très rare qu'une protéine kinase fixe les acides nucléiques. Un exemple très particulier cité dans la littérature concerne la protéine RNA-dependent protein kinase (PKR) qui est une sérine /thréonine kinase contrôlant la synthèse protéique par phosphorylation de la sous unité  $\alpha$  du facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2 $\alpha$ ) sur le résidu sérine 55, ce qui entraîne l'inhibition de la

traduction (McKenna et al., 2007). Cette protéine possède deux domaines de fixation d'ARN (RBD) double brin et les résultats ont montré que la fixation de l'ARN et l'autophosphorylation de la protéine sont indispensables à sa dimérisation et son activité. Mais l'analyse de la séquence de FU n'a pas montré de motifs pouvant suggérer la fixation d'ARN. Des travaux récents sur l'activation du complexe TOR 2 chez les mammifères (mTORC2) ont montré que ce complexe interagit physiquement avec le ribosome et cette interaction joue un rôle très important dans l'activité kinase de ce complexe. En effet, l'interaction avec le ribosome n'a pas d'effet sur la synthèse des protéines mais plutôt sur la phosphorylation des protéines substrats de ce complexe comme l'AGC kinase Akt. Ce complexe intervient via la phosphorylation de l'Akt, dans le maintien de la survie cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Les résultats suggèrent que le ribosome active le mTORC2 via une interaction directe, ce qui assure un mécanisme de régulation de ce complexe qui ne sera actif que dans les cellules en croissance (Zinzalla et al., 2011).

Un alignement de séquence entre les séquences d'ARN 16 et 23S de drosophile, d'*E.coli* et d'homme ont montré des régions d'ARN très conservées entre ces trois organismes. Ce qui suggère une affinité de FU pour l'ARN ribosomale de drosophile. En effet, le modèle de FUSED montre une région chargée positivement (Figure 66) et accessible qui pourrait éventuellement interagir avec des acides nucléiques chargés négativement.



**Figure 66: Surface électrostatique du modèle du domaine Kinase de FU.** La surface montre une face de la protéine chargée positivement qui pourrait interagir avec des acides nucléiques chargés négativement.

Cependant FU montre plutôt une affinité pour l'ARN ribosomale d'*E.Coli*. Il faut noter que cet ARN est très abondant dans la bactérie. Afin de confirmer cette interaction avec l'ARN et tester s'il s'agit d'une fixation spécifique, nos collaborateurs à l'Institut Jacques Monod ont réalisé une co-immunoprécipitation de FU à partir des cellules S2 et ont analysé la fraction obtenue sur un gel d'agarose. Le résultat préliminaire montre aussi une bande sur le gel d'agarose ce qui confirme que FU co-précipite avec un acide nucléique. Un traitement à la RNase sur la même fraction entraîne la disparition de cette bande sur gel après digestion ce qui confirme aussi que cet acide nucléique est de l'ARN. La protéine FU fixe les acides nucléiques et plus particulièrement l'ARN même en cellules d'insectes confirmant l'affinité de cette protéine pour l'ARN. Nous allons maintenant essayer de caractériser l'ARN co-précipité avec FU à partir des cellules d'insectes en essayant de le séquencer afin de déterminer s'il s'agit de l'ARN ribosomale de drosophile ou d'un autre ARN.

Déterminer le type d'ARN avec lequel FU interagit va nous conduire à la fonction jouée par ce complexe dans la cellule. La diminution de l'autophosphorylation suggère déjà que la fixation de l'ARN a une influence sur l'activité de FU. Nous pourrions alors déterminer si cette fixation intervient dans la régulation de la voie HH ou d'une autre voie dans la cellule de drosophile.

## **II. SUFU :**

La protéine SUFU est un régulateur négatif de la voie HH connue pour être un antagoniste de FU (Preat, 1992b) (Kogerman et al., 1999) (Cooper et al., 2005) (Svard et al., 2006). En effet SUFU séquestre la forme longue de CI dans le cytoplasme quand la voie HH n'est pas activée. La phosphorylation de SUFU par FU suite à une activation de la voie HH entraîne la dissociation du complexe CI-SUFU et la migration de CI-155 dans le noyau (Ohlmeyer and Kalderon, 1998). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la caractérisation en solution de la protéine SUFU de drosophile. J'ai réussi à exprimer, sous forme soluble, la protéine entière dans les bactéries avec une étiquette 6-Histidine. Les conditions de purification ont été optimisées et j'ai réussi à obtenir des rendements suffisants pour caractériser la protéine avec des techniques biochimiques et biophysiques.



## A. Caractérisation de SUFU en solution :

Nous avons pu montrer que la protéine est monomérique en solution et nous avons pu obtenir un modèle *ab initio* par SAXS, compatible avec l'existence de deux domaines bien repliés avec un long « linker ». Ces résultats montrent que SUFU a une structure lui permettant de jouer le rôle de plateforme d'interaction et que les deux domaines de SUFU peuvent assurer des interactions avec FU, les deux domaines de CI (Merchant et al., 2004) ou d'autres partenaires sans savoir si cette interaction est simultanée. La protéine SUFU est donc monomérique en solution avec une forme allongée et la présence de la grande boucle entre les deux domaines N et C-terminaux montre que SUFU est très flexible et que dans la cellule, cette flexibilité permettrait à la protéine d'assurer des interactions avec ses partenaires. Or, le domaine N-terminal cristallisé montré des contacts cristallins avec la sous unité B dans l'unité asymétrique du cristal, ce qui souligne la capacité d'interagir avec d'autres protéines (Merchant et al., 2004). La résolution de la structure tridimensionnelle de SUFU sous sa forme entière permettrait de confirmer les modèles obtenus par SAXS, mais la cristallisation risque d'être difficile du fait de la mobilité des deux domaines en absence de partenaires.

La protéine SUFU ne montre pas d'homologie avec des protéines de fonctions connues. Avec un alignement multiple des différentes séquences de SUFU existantes à travers les espèces nous avons pu montrer que SUFU contient des résidus très conservés localisés sur une même face de la protéine. De plus cette analyse a montré que seul le domaine N-terminal de SUFU (appelé domaine SUFU de type PFAM dans les bases de données) existe chez toutes les espèces. En revanche, le domaine C-terminal ne se retrouve que chez les animaux. Une étude récente a permis de mettre en évidence un nouveau système immunitaire chez les bactéries. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la famille SUFU possède un domaine très conservé qui assure un rôle de défense contre les différentes toxines de type nucléases. Cette étude a montré aussi que dans ce système, le domaine SUFU joue le rôle d'un adaptateur moléculaire pour le recrutement d'autres protéines ou de toxines (Zhang et al., 2011). Ce qui montre que chez différentes espèces, le domaine SUFU joue le rôle de protéine d'échafaudage et recrute ses partenaires en assurant des interactions.

## B. SUFU fixe les cations :

L'analyse de séquence de SUFU a révélé l'existence d'un motif HWHY dans le domaine N-terminal de la protéine. Après recherche de structures existantes dans le PDB contenant ce motif, nous avons constaté que ce motif est caractéristique de la fixation des cations ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ...). Nous avons alors vérifié, par un test de fluorescence sur la ligne PROXEMA 1 au synchrotron Soleil, la présence de ces cations dans la protéine recombinante que nous avons purifiée.

Les résultats ont montré la présence de différents cations purifiés avec SUFU : Fer, Zinc, Cuivre et Nickel, ce qui suggère que SUFU est capable de fixer les cations. Cependant, aucune relation n'a été trouvée entre la voie HH et le métabolisme des cations. Cette interaction avec les cations est spécifique à SUFU et pourrait jouer un rôle important dans son activation. En effet, SUFU interagit directement avec CI qui possède un domaine à doigts de Zinc. Les résultats obtenus suggèrent que l'interaction entre les deux protéines peut être assurée par l'interaction des résidus des deux protéines avec ces cations ce qui permettrait la stabilisation du complexe dans la cellule quand la voie HH n'est pas activée. La fixation des cations peut intervenir directement aussi sur l'interaction avec la protéine FU quand la voie HH est activée. Il existe des cas où l'interaction entre deux partenaires est dépendante de la présence d'un cation. Une étude a montré que la protéine transductrice du signal Wnt : Dishevelled (Dsh) interagit directement *in vivo* et *in vitro* avec la protéine naked (Nkd). En effet, le gène *nkd* a été identifié comme gène de segmentation au cours du développement embryonnaire chez la drosophile. La protéine Nkd codée par ce gène est un régulateur négatif agissant par une boucle de rétrocontrôle pour réguler l'activité Wingless/Wnt dans l'embryon. Cette régulation se fait par une interaction directe avec la protéine Dsh qui à son tour va agir directement sur le complexe intracellulaire contrôlant la phosphorylation de la protéine Arm/ $\beta$ -catenin et donc l'activation de la voie Wnt et la transcription des gènes cibles (Zeng et al., 2000). Les auteurs ont montré que l'interaction entre *nkd* et Dsh est dépendante du zinc et non pas du Calcium et que cette interaction régule l'activité de Nkd *in vivo* (Rousset et al., 2002). En effet, ils suggèrent que l'interaction avec le zinc puisse entraîner des changements de conformation dans la région d'interaction sur cette protéine facilitant son interaction avec Dsh. En absence de Zinc, Nkd adopte une autre conformation qui empêcherait l'interaction entre les deux protéines. Les métallothioneines, connues pour leur rôle dans le maintien de l'homéostasie du zinc, peuvent jouer le rôle de métallo chaperonnes pour

réguler l'interaction entre Dsh et Nkd en régulant la distribution du zinc à cette dernière. Ce mécanisme de régulation d'interaction entre des protéines peut être transposé chez la voie HH et peut constituer un des mécanismes de régulation de l'interaction de SUFU avec ses partenaires. Le changement de conformation lié à la fixation de cations jouerait le rôle de sélection de partenaires en fonction de l'état de l'activation de la voie

Afin de confirmer le rôle de ce motif dans la fixation des cations par SUFU, la mutation des deux histidines de ce motif doit être réalisée. Le mutant sera alors testé pour sa capacité à fixer les cations dans les mêmes conditions que la protéine sauvage. L'importance fonctionnelle de la fixation des cations par SUFU sera aussi testée dans les cellules de drosophile, en testant l'effet sur le sauvetage des phénotypes de *fu*<sup>-</sup>. L'importance de cette fonction de SUFU dans la régulation de la voie HH pourra alors être mise en évidence.

### III. Interaction SUFU-MLF :

La protéine MLF est un nouveau membre identifié par un crible double destiné à trouver de nouveaux partenaires de la protéine SUFU. L'interaction entre ces deux protéines a été confirmée par la suite *in vitro* par des coimmunoprécipitations et *in vivo* par des tests de co-localisation (Fouix et al., 2003). Cependant ces études ne montrent pas qu'il s'agit d'une interaction directe entre les deux protéines. Nous nous sommes intéressés à la caractérisation de ces deux protéines *in vitro* et de mettre en évidence le complexe entre les deux dans le but de résoudre sa structure pour déterminer les régions d'interaction et l'affinité entre les deux protéines. Nous avons pu mettre en évidence une interaction directe entre les deux protéines en exprimant séparément la protéine SUFU et un domaine central très conservé de la protéine MLF de drosophile par des mesures de calorimétrie. En effet, les résultats obtenus par calorimétrie, montrent que les deux protéines forment un complexe *in vitro* avec une affinité de l'ordre de 2  $\mu$ M. La formation de complexe a été confirmée aussi en coexprimant les deux protéines sous leurs formes entières dans les bactéries. Le complexe a pu être purifié grâce à une étiquette histidine sur SUFU. Ce complexe résiste aussi à une colonne de tamis moléculaire, montrant une certaine stabilité dans les interactions. En effet, nous n'avons pas pu purifier la protéine MLF seule sous sa forme entière. La protéine est très instable et agrège pour se retrouver dans des corps d'inclusion. En la coexprimant avec SUFU, l'interaction a permis de la stabiliser. Ce qui

suggère que MLF ne doit pas se trouver seule dans le cytoplasme. Elle est toujours en complexe avec ses partenaires et parmi eux SUFU.

Même si le complexe SUFU-MLF est stable, l'affinité entre les deux protéines n'est pas très importante. Les résultats suggèrent que d'autre partenaire peuvent interagir dans la cellule avec eux pour stabiliser davantage le complexe. CI semble être un bon candidat pour former un complexe ternaire. En effet, les trois protéines sont capables de migrer dans le noyau (Fouix et al., 2003) (Sisson et al., 2006) et sont directement impliquées dans la régulation de la transcription des gènes.

## ***CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES***

## ***Conclusions et Perspectives***

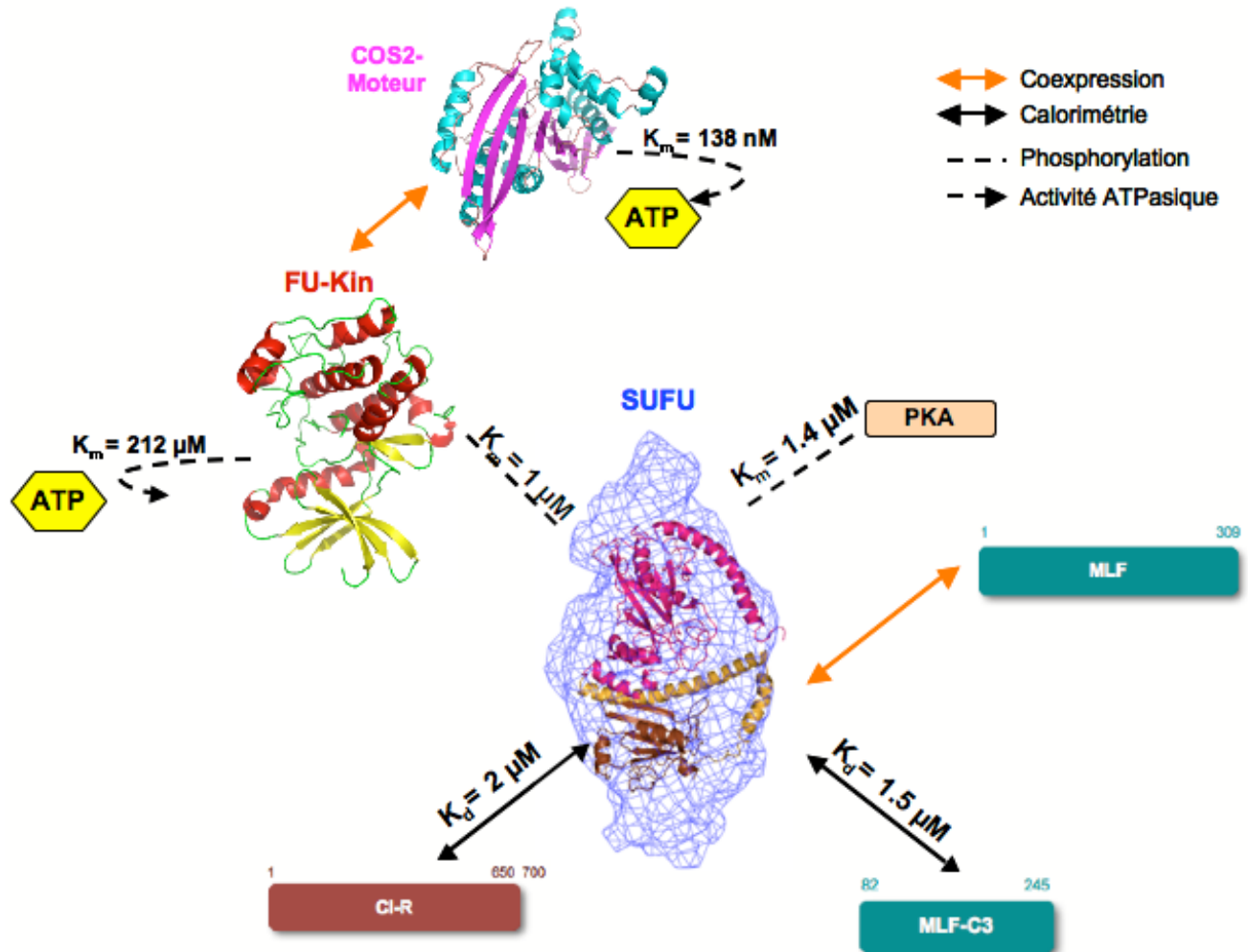
Pour réaliser des études de biologie structurale, il est nécessaire de disposer de plusieurs milligrammes de protéines pures et homogènes. Au début de ma thèse, le laboratoire ne disposait d'aucune protéine de la voie HH et j'ai dû mettre en place les conditions d'expression de plusieurs protéines. Différentes protéines ont été clonées dans des vecteurs d'expression bactériens avec des étiquettes d'affinité puis testées pour leur rendement d'expression et de solubilité. Ainsi la protéine SUFU, un domaine de la kinase FU, la forme répressive du facteur de transcription CI (CI-R), le domaine moteur de la protéine COS2 et la protéine MLF s'expriment bien en bactéries. De plus les conditions de purification que j'ai mises au point m'ont permis d'obtenir des quantités suffisantes pour les études biochimiques, enzymatiques et structurales (Figure 67).

J'ai pu montrer que SUFU s'exprime bien et de manière soluble dans les bactéries, les bons rendements de purification m'ont permis de la caractériser en solution par des techniques biophysiques comme le SEC-MALLS et le CD. J'ai ainsi montré que SUFU est bien repliée et monomérique avec une forme allongée en solution et qu'elle a une température de dénaturation de 40°C. Avec des mesures de SAXS nous avons pu obtenir un modèle d'enveloppe de la protéine en solution, qui a révélé que la protéine montre une enveloppe compatible avec de deux domaines bien repliés et d'une longue boucle non structurée. L'analyse de la séquence de SUFU a révélé la présence de motif très conservé qui suggère un rôle d'échafaudage et de plateforme d'interaction pour cette protéine. J'ai pu montrer aussi que SUFU est phosphorylée, *in vitro*, par des extraits cellulaires de drosophile, par FU et par la PKA.

Plusieurs constructions de MLF ont été testées pour leur expression et solubilité. Le domaine central de la protéine (très conservé chez l'homme, la souris et la drosophile) s'exprime très bien et de manière soluble. Des expériences de microcalorimétrie ont montré que SUFU et MLF forment un complexe avec une affinité de l'ordre du micromolaire. Nous avons ainsi validé les constructions de SUFU et MLF, qui sont structurées et interagissent entre elles en solution.

Le domaine kinase de la protéine FU en fusion avec la Glutathion-S-transférase s'exprime bien en bactéries. J'ai pu mettre en évidence l'autophosphorylation de la protéine en présence

d'ATP et j'ai pu montrer que dans certaines conditions notamment la présence de Magnésium dans le tampon de lyse, le domaine kinase de FU est copurifié avec de l'ARN ribosomal.



**Figure 67 : SUFU est une plateforme d'interaction protéine-protéine.** Le modèle résume les différentes constructions purifiées ainsi que les différentes interactions entre les membres du HTC mises en évidence. L'enveloppe de SUFU obtenue par SAXS est au centre du modèle. Les interactions directes avec les différents partenaires sont représentées par des flèches à double sens pleines. La phosphorylation de SUFU par FU et par la PKA est représentée en trait pointillé. Les activités ATPasiques du domaine kinase de FU et du domaine moteur de COS2 (Modèles obtenus par le programme Phyre ; modèle de COS2 basé sur la structure avec le code PDB d1X8) sont représentées par des flèches en pointillé. Les différents  $K_d$  obtenues sont indiquées sur les flèches.

Il est clair cependant que les protéines HH cytoplasmiques ne sont pas très stables quand elles sont exprimées seules en bactéries. La co-expression des partenaires permettrait de les

stabiliser et d'améliorer les rendements de purification. Il est donc intéressant de co-exprimer : SUFU-FU, SUFU-CI et FU-COS2 dans les bactéries. Après purification des différentes constructions, une étude structurale sera possible et la résolution de la structure tridimensionnelle des différents complexes nous renseignera sur les mécanismes d'interaction et de recrutement des différents partenaires.

La caractérisation de SUFU en solution a permis de mettre en évidence un motif très conservé impliqué dans la fixation des cations : le motif HWHY. Les résultats préliminaires obtenus montrent que la protéine SUFU recombinante est copurifiée avec différents cations comme le fer ou le zinc. La mutation des deux histidines de ce motif chez SUFU va nous permettre de tester le rôle de ce motif dans la fixation des cations et de tester l'effet de ces mutations et donc l'effet de la fixation des cations sur l'activité de SUFU dans la cellule.

Pour FU et après optimisation des conditions de purification du domaine kinase, la suite de la caractérisation de l'autophosphorylation de ce domaine, d'une part, par des marquages avec de l'ATP radioactif ou par spectrométrie de masse, va nous permettre d'identifier les résidus impliqués dans cette réaction. L'importance de ces résidus sera confirmée par les mutants spécifiques et par des tests d'activation de la voie HH dans les cellules de drosophile. D'autre part, la mise en évidence de la fixation de l'ARN par FU dans les cellules de drosophile et l'identification de ce dernier, va nous permettre de mettre en évidence l'importance de cette interaction sur la régulation de la voie HH.

Enfin, le domaine moteur de la kinésine COS2 s'exprime bien en bactéries. La suite de sa caractérisation en solution va nous permettre de résoudre sa structure tridimensionnelle et de mettre en évidence son activité ATPasique *in vitro* en présence ou en absence de microtubules. Ce qui va nous permettre aussi de confirmer son rôle de domaine moteur et de déterminer pour la première fois ses caractéristiques cinétiques.



# ***BIBLIOGRAPHIE***

## **Bibliographie**

- Aanstad, P., Santos, N., Corbit, K.C., Scherz, P.J., Trinh le, A., Salvenmoser, W., Huisken, J., Reiter, J.F., and Stainier, D.Y. (2009). The extracellular domain of Smoothed regulates ciliary localization and is required for high-level Hh signaling. *Curr Biol* 19, 1034-1039.
- Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W.A., and Perron, M. (2007). A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* 6, 156-159.
- Aikin, R.A., Ayers, K.L., and Therond, P.P. (2008). The role of kinases in the Hedgehog signalling pathway. *EMBO Rep* 9, 330-336.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., and Hooper, J.E. (1996). The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86, 221-232.
- 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. *Mech Dev* 78, 17-31.
- Apionishev, S., Katanayeva, N.M., Marks, S.A., Kalderon, D., and Tomlinson, A. (2005). *Drosophila* Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nat Cell Biol* 7, 86-92.
- Asai, J., Takenaka, H., Kusano, K.F., Ii, M., Luedemann, C., Curry, C., Eaton, E., Iwakura, A., Tsutsumi, Y., Hamada, H., *et al.* (2006). Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* 113, 2413-2424.
- Ascano, M., Jr., Nybakken, K.E., Sosinski, J., Stegman, M.A., and Robbins, D.J. (2002). The Carboxyl-Terminal Domain of the Protein Kinase Fused Can Function as a Dominant Inhibitor of Hedgehog Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1555-1566.
- Ascano, M., Jr., and Robbins, D.J. (2004). An Intramolecular Association between Two Domains of the Protein Kinase Fused Is Necessary for Hedgehog Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10397-10405.
- Ayers, K.L., Gallet, A., Staccini-Lavenant, L., and ThÈron, P.P. (2010). The Long-Range Activity of Hedgehog Is Regulated in the Apical Extracellular Space by the Glypican Dally and the Hydrolase Notum. *Developmental Cell* 18, 605-620.
- Aza-Blanc, P., and Kornberg, T.B. (1999). Ci: a complex transducer of the hedgehog signal. *Trends Genet* 15, 458-462.
- Aza-Blanc, P., RamÌrez-Weber, F.-A., Laget, M.-P., Schwartz, C., and Kornberg, T.B. (1997). Proteolysis That Is Inhibited by Hedgehog Targets Cubitus interruptus Protein to the Nucleus and Converts It to a Repressor. *Cell* 89, 1043-1053.
- Baeg, G.H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S., and Perrimon, N. (2001). Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 128, 87-94.
- Bai, C.B., Stephen, D., and Joyner, A.L. (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* 6, 103-115.

- Barnfield, P.C., Zhang, X., Thanabalasingham, V., Yoshida, M., and Hui, C.-c. (2005). Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. *Differentiation* 73, 397-405.
- Basler, K., and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of Drosophila limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208-214.
- Beckett, K., Franch-Marro, X., and Vincent, J.P. (2008). Glypican-mediated endocytosis of Hedgehog has opposite effects in flies and mice. *Trends Cell Biol* 18, 360-363.
- Belenkaya, T.Y., Han, C., Yan, D., Opoka, R.J., Khodoun, M., Liu, H., and Lin, X. (2004). Drosophila Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans. *Cell* 119, 231-244.
- Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., Traverso, G., Siegel-Bartelt, J., Frumkin, A., Mitchell, H.F., Donis-Keller, H., Helms, C., Hing, A.V., *et al.* (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14, 353-356.
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N., and Beachy, P.A. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425, 846-851.
- Besse, F., Busson, D., and Pret, A.M. (2005). Hedgehog signaling controls Soma-Germen interactions during Drosophila ovarian morphogenesis. *Dev Dyn* 234, 422-431.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D.P., Williams, K.P., Chadwick, K., Ling, L.E., Karanu, F.N., and Bhatia, M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2, 172-180.
- Bidet, M., Joubert, O., Lacombe, B., Ciantar, M., Nehme, R., Mollat, P., Bretillon, L., Faure, H., Bittman, R., Ruat, M., and Mus-Veteau, I. (2011). The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS ONE* 6, e23834.
- Binns, W., James, L.F., Shupe, J.L., and Everett, G. (1963). A Congenital Cyclopien-Type Malformation in Lambs Induced by Maternal Ingestion of a Range Plant, *Veratrum Californicum*. *Am J Vet Res* 24, 1164-1175.
- Bishop, B., Aricescu, A.R., Harlos, K., O'Callaghan, C.A., Jones, E.Y., and Siebold, C. (2009). Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. *Nat Struct Mol Biol* *advanced online publication*.
- Bornemann, D.J., Duncan, J.E., Staatz, W., Selleck, S., and Warrior, R. (2004). Abrogation of heparan sulfate synthesis in Drosophila disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* 131, 1927-1938.
- Bosanac, I., Maun, H.R., Scales, S.J., Wen, X., Lingel, A., Bazan, J.F., de Sauvage, F.J., Hymowitz, S.G., and Lazarus, R.A. (2009). The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. *Nat Struct Mol Biol* *advanced online publication*.
- Briscoe, J., and Ericson, J. (1999). The specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10, 353-362.

- Briscoe, J., and Ericson, J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Current Opinion in Neurobiology* *11*, 43-49.
- Burglin, T.R. (2008). The Hedgehog protein family. *Genome Biol* *9*, 241.
- Burke, R., and Basler, K. (1997). Hedgehog signaling in *Drosophila* eye and limb development - conserved machinery, divergent roles? *Curr Opin Neurobiol* *7*, 55-61.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., and Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* *99*, 803-815.
- Byrd, N., and Grabel, L. (2004). Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* *14*, 308-313.
- Callejo, A., Biloni, A., Mollica, E., Gorfinkiel, N., Andres, G., Ibanez, C., Torroja, C., Doglio, L., Sierra, J., and Guerrero, I. (2011). Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the *Drosophila* wing disk epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 12591-12598.
- Callejo, A., Torroja, C., Quijada, L., and Guerrero, I. (2006). Hedgehog lipid modifications are required for Hedgehog stabilization in the extracellular matrix. *Development* *133*, 471-483.
- Capurro, M.I., Xu, P., Shi, W., Li, F., Jia, A., and Filmus, J. (2008). Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell* *14*, 700-711.
- Carroll, C.E., Marada, S., Stewart, D.P., Ouyang, J.X., and Ogden, S.K. (2012). The extracellular loops of Smoothed play a regulatory role in control of Hedgehog pathway activation. *Development* *139*, 612-621.
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., *et al.* (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* *277*, 228-231.
- Chamoun, Z., Mann, R.K., Nellen, D., von Kessler, D.P., Bellotto, M., Beachy, P.A., and Basler, K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* *293*, 2080-2084.
- Chang, D.T., Lopez, A., von Kessler, D.P., Chiang, C., Simandl, B.K., Zhao, R., Seldin, M.F., Fallon, J.F., and Beachy, P.A. (1994). Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* *120*, 3339-3353.
- Charytoniuk, D., Porcel, B., Rodriguez Gomez, J., Faure, H., Ruat, M., and Traiffort, E. (2002). Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J Physiol Paris* *96*, 9-16.
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev* *16*, 2743-2748.
- Chen, M.-H., Li, Y.-J., Kawakami, T., Xu, S.-M., and Chuang, P.-T. (2004). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev.* *18*, 641-659.
- Chen, M.-H., Wilson, C.W., and Chuang, P.-T. (2007). SnapShot: Hedgehog Signaling Pathway. *Cell* *130*, 386-386.e382.

- Chen, M.-H., Wilson, C.W., Li, Y.-J., Law, K.K.L., Lu, C.-S., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C.-c., and Chuang, P.-T. (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes & Development* 23, 1910-1928.
- Chen, M.H., Gao, N., Kawakami, T., and Chuang, P.T. (2005). Mice deficient in the fused homolog do not exhibit phenotypes indicative of perturbed hedgehog signaling during embryonic development. *Mol Cell Biol* 25, 7042-7053.
- Chen, Y., Gallaher, N., Goodman, R.H., and Smolik, S.M. (1998). Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2349-2354.
- Chen, Y., Yue, S., Xie, L., Pu, X.H., Jin, T., and Cheng, S.Y. (2011). Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem* 286, 13502-13511.
- Chuang, P.-T., and McMahon, A.P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-621.
- Claret, S., Sanial, M., and Plessis, A. (2007). Evidence for a novel feedback loop in the Hedgehog pathway involving Smoothed and Fused. *Curr Biol* 17, 1326-1333.
- 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, 165-172.
- Cooper, A.F., Yu, K.P., Brueckner, M., Brailey, L.L., Johnson, L., McGrath, J.M., and Bale, A.E. (2005). Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development* 132, 4407-4417.
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y.R., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018-1021.
- 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, 876-881.
- Dale, J.K., Vesque, C., Lints, T.J., Sampath, T.K., Furley, A., Dodd, J., and Placzek, M. (1997). Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90, 257-269.
- Das, D., Finn, R.D., Abdubek, P., Astakhova, T., Axelrod, H.L., Bakolitsa, C., Cai, X., Carlton, D., Chen, C., Chiu, H.-J., *et al.* (2010). The crystal structure of a bacterial Sufu-like protein defines a novel group of bacterial proteins that are similar to the N-terminal domain of human Sufu. *Protein Science* 19, 2131-2140.
- David, G., and Perez, J. (2009). Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. *Journal of applied crystallography* 42, 892-900.
- Day, E.S., Wen, D., Garber, E.A., Hong, J., Avedissian, L.S., Rayhorn, P., Shen, W., Zeng, C., Bailey, V.R., Reilly, J.O., *et al.* (1999). Zinc-dependent structural stability of human Sonic hedgehog. *Biochemistry* 38, 14868-14880.

- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., and Cohen, S.M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521-531.
- Deshaies, R.J. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 435-467.
- Detmer, K., Thompson, A.J., Garner, R.E., Walker, A.N., Gaffield, W., and Dannawi, H. (2005). Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 34, 60-70.
- Diaz-Benjumea, F.J., Cohen, B., and Cohen, S.M. (1994). Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* 372, 175-179.
- Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N.P., Guo, G.R., Veelken, H., Engelhardt, M., Mertelsmann, R., Kelleher, J.F., *et al.* (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med* 13, 944-951.
- Ding, Q., Fukami, S., Meng, X., Nishizaki, Y., Zhang, X., Sasaki, H., Dlugosz, A., Nakafuku, M., and Hui, C. (1999). Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol* 9, 1119-1122.
- Doble, B.W., and Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116, 1175-1186.
- Dominguez, M. (1999). Dual role for Hedgehog in the regulation of the proneural gene *atonal* during ommatidia development. *Development* 126, 2345-2353.
- Dussillol-Godar, F., Brissard-Zahraoui, J., Limbourg-Bouchon, B., Boucher, D., Fouix, S., Lamour-Isnard, C., Plessis, A., and Busson, D. (2006). Modulation of the Suppressor of fused protein regulates the Hedgehog signaling pathway in *Drosophila* embryo and imaginal discs. *Dev Biol* 291, 53-66.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Ekker, S.C., McGrew, L.L., Lai, C.J., Lee, J.J., von Kessler, D.P., Moon, R.T., and Beachy, P.A. (1995a). Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*. *Development* 121, 2337-2347.
- Ekker, S.C., Ungar, A.R., Greenstein, P., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Moon, R.T., and Beachy, P.A. (1995b). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol* 5, 944-955.
- Endoh-Yamagami, S., Evangelista, M., Wilson, D., Wen, X., Theunissen, J.-W., Phamluong, K., Davis, M., Scales, S.J., Solloway, M.J., de Sauvage, F.J., and Peterson, A.S. (2009). The Mammalian Cos2 Homolog Kif7 Plays an Essential Role in Modulating Hh Signal Transduction during Development. *Current Biology* *In Press, Corrected Proof*.
- Eswar, N., Eramian, D., Webb, B., Shen, M.Y., and Sali, A. (2008). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 426, 145-159.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A. (2007). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 2, Unit 2 9*.

- Eugster, C., Panakova, D., Mahmoud, A., and Eaton, S. (2007). Lipoprotein-Heparan Sulfate Interactions in the Hh Pathway. *Developmental Cell* *13*, 57-71.
- Fändrich, M., Forge, V., Buder, K., Kittler, M., Dobson, C.M., and Diekmann, S. (2003). Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 15463-15468.
- Farzan, S.F., Ascano Jr, M., Ogden, S.K., Sanial, M., Brigui, A., Plessis, A., and Robbins, D.J. (2008). Costal2 Functions as a Kinesin-like Protein in the Hedgehog Signal Transduction Pathway. *Current Biology* *18*, 1215-1220.
- Farzan, S.F., Stegman, M.A., Ogden, S.K., Ascano, M., Black, K.E., Tacchelly, O., and Robbins, D.J. (2009). A quantification of pathway components supports a novel model of Hedgehog signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, M109.041608.
- Figuera-Losada, M., and Lograsso, P.V. (2012). Enzyme Kinetics and Interaction Studies for Human JNK1beta1 and Substrates Activating Transcription Factor 2 (ATF2) and c-Jun N-terminal kinase (c-Jun). *J Biol Chem* *287*, 13291-13302.
- Filmus, J., and Selleck, S.B. (2001). Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* *108*, 497-501.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., *et al.* (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* *38*, D211-D222.
- Flotow, H., Graves, P.R., Wang, A.Q., Fiol, C.J., Roeske, R.W., and Roach, P.J. (1990). Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J Biol Chem* *265*, 14264-14269.
- Forbes, A.J., Nakano, Y., Taylor, A.M., and Ingham, P.W. (1993). Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. *Dev Suppl*, 115-124.
- Forde, J.E., and Dale, T.C. (2007). Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* *64*, 1930-1944.
- Fouix, S., Martin-LannerÈe, S., Sanial, M., Morla, L., Lamour-Isnard, C., and Plessis, A. (2003). Over-expression of a novel nuclear interactor of Suppressor of fused, the *Drosophila* myelodysplasia/myeloid leukaemia factor, induces abnormal morphogenesis associated with increased apoptosis and DNA synthesis. *Genes to Cells* *8*, 897-911.
- Franke, D., and Svergun, D.I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of applied crystallography* *42*, 342-346.
- Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S., and Nakato, H. (2003). Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* *130*, 1515-1522.
- Fukumoto, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fujisawa, K., Nagata, S., and Fukunaga, R. (2001). The Fused Protein Kinase Regulates Hedgehog-stimulated Transcriptional Activation in *Drosophila* Schneider 2 Cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 38441-38448.
- Gallet, A., Rodriguez, R., Ruel, L., and Therond, P.P. (2003). Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog. *Dev Cell* *4*, 191-204.

- Gallet, A., Staccini-Lavenant, L., and Therond, P.P. (2008). Cellular trafficking of the glypican Dally-like is required for full-strength Hedgehog signaling and wingless transcytosis. *Dev Cell* *14*, 712-725.
- Gallet, A., and Therond, P.P. (2005). Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Developmental Biology* *277*, 51-62.
- Geourjon, C., and Deleage, G. (1994). SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng* *7*, 157-164.
- Giuliani, A., Jamme, F., Rouam, V., Wien, F., Giorgetta, J.L., Lagarde, B., Chubar, O., Bac, S., Yao, I., Rey, S., *et al.* (2009). DISCO: a low-energy multipurpose beamline at synchrotron SOLEIL. *J Synchrotron Radiat* *16*, 835-841.
- Goetz, J.A., Singh, S., Suber, L.M., Kull, F.J., and Robbins, D.J. (2006). A highly conserved amino-terminal region of sonic hedgehog is required for the formation of its freely diffusible multimeric form. *J Biol Chem* *281*, 4087-4093.
- Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., and Scott, M.P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* *10*, 301-312.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., and Metz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* *15*, 305-308.
- Greenfield, N.J. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* *1*, 2527-2535.
- Gupta, S., Takebe, N., and Lorusso, P. (2011). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol* *2*, 237-250.
- Hahn, H., Christiansen, J., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Chidambaram, A., Gerrard, B., Vorechovsky, I., Bale, A.E., Toftgard, R., Dean, M., and Wainwright, B. (1996). A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* *271*, 12125-12128.
- Hall, T.M., Porter, J.A., Beachy, P.A., and Leahy, D.J. (1995). A potential catalytic site revealed by the 1.7-Å crystal structure of the amino-terminal signalling domain of Sonic hedgehog. *Nature* *378*, 212-216.
- Han, Y.G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.M., 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. *Nat Neurosci* *11*, 277-284.
- Heberlein, U., Singh, C.M., Luk, A.Y., and Donohoe, T.J. (1995). Growth and differentiation in the *Drosophila* eye coordinated by hedgehog. *Nature* *373*, 709-711.
- Hegde, G.V., Peterson, K.J., Emanuel, K., Mittal, A.K., Joshi, A.D., Dickinson, J.D., Kollessery, G.J., Bociek, R.G., Bierman, P., Vose, J.M., *et al.* (2008). Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol Cancer Res* *6*, 1928-1936.
- Ho, K.S., Suyama, K., Fish, M., and Scott, M.P. (2005). Differential regulation of Hedgehog target gene transcription by Costal2 and Suppressor of Fused. *Development* *132*, 1401-1412.



- Hooper, J.E., and Scott, M.P. (2005). COMMUNICATING WITH HEDGEHOGS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 306-317.
- 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., *et al.* (2009). Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14132-14137.
- Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059-3087.
- Ingham, P.W., Nakano, Y., and Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet* 12, 393-406.
- Ingham, P.W., Taylor, A.M., and Nakano, Y. (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* 353, 184-187.
- Innis, C.A., Shi, J., and Blundell, T.L. (2000). Evolutionary trace analysis of TGF-beta and related growth factors: implications for site-directed mutagenesis. *Protein Eng* 13, 839-847.
- Jacob, J., and Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* 4, 761-765.
- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L., and Jiang, J. (2004). Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 432, 1045-1050.
- Jiang, J., Hui, C.C., Tsanev, R., Tiigimagi, P., Michelson, P., Metsis, M., Osterlund, T., Kogerman, P., Jia, H., Liu, Y., *et al.* (2008). Hedgehog signaling in development and cancer: Identification of the gene transcription repressor domain of Gli3 PP4 and PP2A regulate Hedgehog signaling by controlling Smo and Ci phosphorylation- Possible novel targets for therapeutic angiogenesis. *Dev Cell* 15, 801-812.
- Jiang, J., and Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391, 493-496.
- Johnson, R.L., Laufer, E., Riddle, R.D., and Tabin, C. (1994). Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* 79, 1165-1173.
- Johnson, R.L., Rothman, A.L., Xie, J., Goodrich, L.V., Bare, J.W., Bonifas, J.M., Quinn, A.G., Myers, R.M., Cox, D.R., Epstein, E.H., Jr., and Scott, M.P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668-1671.
- Johnson, R.L., Zhou, L., and Bailey, E.C. (2002). Distinct consequences of sterol sensor mutations in *Drosophila* and mouse patched homologs. *Dev Biol* 242, 224-235.
- 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. *J Biol Chem* 278, 8244-8249.
- Karhadkar, S.S., Steven Bova, G., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., and Beachy, P.A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707 - 712.
- Katanaev, V.L., Solis, G.P., Hausmann, G., Buestorf, S., Katanayeva, N., Schrock, Y., Stuermer, C.A., and Basler, K. (2008). Reggie-1/flotillin-2 promotes secretion of the long-range signalling forms of Wingless and Hedgehog in *Drosophila*. *Embo J* 27, 509-521.

- Katoh, Y., and Katoh, M. (2004). KIF27 is one of orthologs for *Drosophila* Costal-2. *Int J Oncol* 25, 1875-1880.
- Kavran, J.M., Ward, M.D., Oladosu, O.O., Mulepati, S., and Leahy, D.J. (2010). All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *J Biol Chem* 285, 24584-24590.
- Kawakami, T., Kawcak, T., Li, Y.J., Zhang, W., Hu, Y., and Chuang, P.T. (2002). Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development* 129, 5753-5765.
- Kazemi-Esfarjani, P., and Benzer, S. (2002). Suppression of polyglutamine toxicity by a *Drosophila* homolog of myeloid leukemia factor 1. *Hum Mol Genet* 11, 2657-2672.
- Keeler, R.F. (1969). Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). VII. The structure of the glycosidic alkaloid cycloposine. *Steroids* 13, 579-588.
- Khaliullina, H., Panakova, D., Eugster, C., Riedel, F., Carvalho, M., and Eaton, S. (2009). Patched regulates Smoothed trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development* 136, 4111-4121.
- Klejnot, M., and Kozielski, F. (2012). Structural insights into human Kif7, a kinesin involved in Hedgehog signalling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68, 154-159.
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Uden, A.B., Sandstedt, B., Toftgard, R., and Zaphiropoulos, P.G. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1, 312-319.
- Konarev, P.V., Volkov, V.V., Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2006). ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* 39, 277-286.
- Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., and Svergun, D.I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* 36, 1277-1282.
- Kusano, K.F., Pola, R., Murayama, T., Curry, C., Kawamoto, A., Iwakura, A., Shintani, S., Ii, M., Asai, J., Tkebuchava, T., *et al.* (2005). Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med* 11, 1197-1204.
- Kuwabara, P.E., and Labouesse, M. (2002). The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends in Genetics* 18, 193-201.
- 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* 104, 8455-8460.
- Lauth, M., and Toftgard, R. (2007). The Hedgehog pathway as a drug target in cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 8, 457-461.
- Lavine, K.J., White, A.C., Park, C., Smith, C.S., Choi, K., Long, F., Hui, C.C., and Ornitz, D.M. (2006). Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes Dev* 20, 1651-1666.

- Lee, J., Wu, X., Pasca di Magliano, M., Peters, E.C., Wang, Y., Hong, J., Hebrok, M., Ding, S., Cho, C.Y., and Schultz, P.G. (2007). A small-molecule antagonist of the hedgehog signaling pathway. *Chembiochem* 8, 1916-1919.
- Lee, J.D., Kraus, P., Gaiano, N., Nery, S., Kohtz, J., Fishell, G., Loomis, C.A., and Treisman, J.E. (2001). An acylatable residue of Hedgehog is differentially required in *Drosophila* and mouse limb development. *Dev Biol* 233, 122-136.
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., and Beachy, P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 266, 1528-1537.
- Lee, J.J., von Kessler, D.P., Parks, S., and Beachy, P.A. (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell* 71, 33-50.
- Lees, J.G., Smith, B.R., Wien, F., Miles, A.J., and Wallace, B.A. (2004). CDtool, an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Analytical Biochemistry* 332, 285-289.
- Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahon, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jacques, B., and McMahon, A.P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105, 599-612.
- Liem, K.F., Jr., Jessell, T.M., and Briscoe, J. (2000). Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127, 4855-4866.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N.S., Jackson, K.W., Suri, P., and Wicha, M.S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66, 6063-6071.
- Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M.A., Tagle, D.A., *et al.* (1997). Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277, 232-235.
- Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R.K., von Kessler, D.P., Taipale, J., Weis-Garcia, F., Gong, R., Wang, B., and Beachy, P.A. (2003). Hedgehog Signal Transduction via Smoothed Association with a Cytoplasmic Complex Scaffolded by the Atypical Kinesin, Costal-2. *Molecular Cell* 12, 1261-1274.
- Malpel, S., Claret, S., Sanial, M., Brigui, A., Piolot, T., Daviet, L., Martin-Lannere, S., and Plessis, A. (2007). The last 59 amino acids of Smoothed cytoplasmic tail directly bind the protein kinase Fused and negatively regulate the Hedgehog pathway. *Developmental Biology* 303, 121-133.
- Marigo, V., Roberts, D.J., Lee, S.M., Tsukurov, O., Levi, T., Gastier, J.M., Epstein, D.J., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Seidman, C.E., and *et al.* (1995). Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28, 44-51.
- Marigo, V., Scott, M.P., Johnson, R.L., Goodrich, L.V., and Tabin, C.J. (1996). Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* 122, 1225-1233.

- Marti, E., and Bovolenta, P. (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 25, 89-96.
- Martin-Lannere, S., Lasbleiz, C., Sanial, M., Fouix, S., Besse, F., Tricoire, H., and Plessis, A. (2006). Characterization of the *Drosophila* myeloid leukemia factor. *Genes Cells* 11, 1317-1335.
- Maun, H.R., Wen, X., Lingel, A., de Sauvage, F.J., Lazarus, R.A., Scales, S.J., and Hymowitz, S.G. (2010). The hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *J Biol Chem* 285, 26.
- McKeegan, K.S., Borges-Walmsley, M.I., and Walmsley, A.R. (2003). The structure and function of drug pumps: an update. *Trends Microbiol* 11, 21-29.
- McKenna, S.A., Lindhout, D.A., Kim, I., Liu, C.W., Gelev, V.M., Wagner, G., and Puglisi, J.D. (2007). Molecular framework for the activation of RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 282, 11474-11486.
- McLellan, J.S., Yao, S., Zheng, X., Geisbrecht, B.V., Ghirlando, R., Beachy, P.A., and Leahy, D.J. (2006). Structure of a heparin-dependent complex of Hedgehog and Ihog. *PNAS* 103, 17208-17213.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* 189, 1-23.
- Merchant, M., Vajdos, F.F., Ultsch, M., Maun, H.R., Wendt, U., Cannon, J., Desmarais, W., Lazarus, R.A., de Vos, A.M., and de Sauvage, F.J. (2004). Suppressor of Fused Regulates Gli Activity through a Dual Binding Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8627-8641.
- Mertens, H.D., and Svergun, D.I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol* 172, 128-141.
- Methot, N., and Basler, K. (2000). Suppressor of fused opposes hedgehog signal transduction by impeding nuclear accumulation of the activator form of Cubitus interruptus. *Development* 127, 4001-4010.
- Methot, N., and Basler, K. (2001). An absolute requirement for Cubitus interruptus in Hedgehog signaling. *Development* 128, 733-742.
- Mohler, J. (1988). Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* 120, 1061-1072.
- Mohler, J., and Vani, K. (1992). Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115, 957-971.
- Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C., and Plessis, A. (1998). Suppressor of fused links Fused and Cubitus interruptus on the Hedgehog signalling pathway. *Current Biology* 8, 583-588.
- Monnier, V., Ho, K.S., Sanial, M., Scott, M.P., and Plessis, A. (2002). Hedgehog signal transduction proteins: contacts of the Fused kinase and Ci transcription factor with the kinesin-related protein Costal2. *BMC Dev Biol* 2, 4.
- Nakano, Y., Nystedt, S., Shivdasani, A.A., Strutt, H., Thomas, C., and Ingham, P.W. (2004). Functional domains and sub-cellular distribution of the Hedgehog transducing protein Smoothed in *Drosophila*. *Mech Dev* 121, 507-518.

- Nakato, H., Futch, T.A., and Selleck, S.B. (1995). The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*. *Development* *121*, 3687-3702.
- Narang, P., Bhushan, K., Bose, S., and Jayaram, B. (2005). A computational pathway for bracketing native-like structures for small alpha helical globular proteins. *Phys Chem Chem Phys* *7*, 2364-2375.
- Narbonne-Reveau, K., Besse, F., Lamour-Isnard, C., Busson, D., and Pret, A.M. (2006). Fused regulates germline cyst mitosis and differentiation during *Drosophila* oogenesis. *Mech Dev* *123*, 197-209.
- NehmÈ, 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 (BBA) - Biomembranes In Press, Uncorrected Proof*.
- Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795-801.
- Nybakken, K.E., Turck, C.W., Robbins, D.J., and Bishop, J.M. (2002). Hedgehog-stimulated Phosphorylation of the Kinesin-related Protein Costal2 Is Mediated by the Serine/Threonine Kinase Fused. *J. Biol. Chem.* *277*, 24638-24647.
- Ogden, S.K., Ascano, M., Jr., Stegman, M.A., and Robbins, D.J. (2004). Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem Pharmacol* *67*, 805-814.
- Ogden, S.K., Fei, D.L., Schilling, N.S., Ahmed, Y.F., Hwa, J., and Robbins, D.J. (2008). G protein G[agr]i functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling. *Nature*.
- Ohlmeyer, J.T., and Kalderon, D. (1998). Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature* *396*, 749-753.
- Ohno, K., Takahashi, Y., Hirose, F., Inoue, Y.H., Taguchi, O., Nishida, Y., Matsukage, A., and Yamaguchi, M. (2000). Characterization of a *Drosophila* homologue of the human myelodysplasia/myeloid leukemia factor (MLF). *Gene* *260*, 133-143.
- Orenic, T., Chidsey, J., and Holmgren, R. (1987). Cell and cubitus interruptus dominant: two segment polarity genes on the fourth chromosome in *Drosophila*. *Dev Biol* *124*, 50-56.
- Ouali, M., and King, R.D. (2000). Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci* *9*, 1162-1176.
- Paine-Saunders, S., Viviano, B.L., and Saunders, S. (1999). GPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with GPC5 on human chromosome 13. *Genomics* *57*, 455-458.
- Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., and Eaton, S. (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* *435*, 58-65.
- Patten, I., and Placzek, M. (2000). The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci* *57*, 1695-1708.
- Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* *261*, 1701-1707.

- Peacock, C.D., Wang, Q., Gesell, G.S., Corcoran-Schwartz, I.M., Jones, E., Kim, J., Devereux, W.L., Rhodes, J.T., Huff, C.A., Beachy, P.A., *et al.* (2007). Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4048-4053.
- Pearse Ii, R.V., Collier, L.S., Scott, M.P., and Tabin, C.J. (1999). Vertebrate Homologs of Drosophila Suppressor of Fused Interact with the Gli Family of Transcriptional Regulators. *Developmental Biology* *212*, 323-336.
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., *et al.* (1998). Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* *273*, 14037-14045.
- Peters, C., Wolf, A., Wagner, M., Kuhlmann, J., and Waldmann, H. (2004). The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8531-8536.
- Pham, A., Therond, P., Alves, G., Tournier, F.B., Busson, D., Lamour-Isnard, C., Bouchon, B.L., Preat, T., and Tricoire, H. (1995). The Suppressor of fused Gene Encodes a Novel PEST Protein Involved in Drosophila Segment Polarity Establishment. *Genetics* *140*, 587-598.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T.M. (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* *97*, 903-915.
- Podlasek, C.A., Meroz, C.L., Korolis, H., Tang, Y., McKenna, K.E., and McVary, K.T. (2005). Sonic hedgehog, the penis and erectile dysfunction: a review of sonic hedgehog signaling in the penis. *Curr Pharm Des* *11*, 4011-4027.
- Pola, R., Ling, L.E., Silver, M., Corbley, M.J., Kearney, M., Blake Pepinsky, R., Shapiro, R., Taylor, F.R., Baker, D.P., Asahara, T., and Isner, J.M. (2001). The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* *7*, 706-711.
- Porter, J.A., Ekker, S.C., Park, W.J., von Kessler, D.P., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter, R.J., Koonin, E.V., and Beachy, P.A. (1996a). Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* *86*, 21-34.
- Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Lee, J.J., Moses, K., and Beachy, P.A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* *374*, 363-366.
- Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1996b). Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* *274*, 255-259.
- Preat, T. (1992). Characterization of Suppressor of fused, a Complete Suppressor of the fused Segment Polarity Gene of Drosophila melanogaster. *Genetics* *132*, 725-736.
- Price, M.A., and Kalderon, D. (1999). Proteolysis of cubitus interruptus in Drosophila requires phosphorylation by protein kinase A. *Development* *126*, 4331-4339.
- Price, M.A., and Kalderon, D. (2002). Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* *108*, 823-835.

- Reilly, J.O., Karavanova, I.D., Williams, K.P., Mahanthappa, N.K., and Allendoerfer, K.L. (2002). Cooperative effects of Sonic Hedgehog and NGF on basal forebrain cholinergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 19, 88-96.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.
- Rizvi, A.Z., Hunter, J.G., and Wong, M.H. (2005). Gut-derived stem cells. *Surgery* 137, 585-590.
- Robarge, K.D., Brunton, S.A., Castaneda, G.M., Cui, Y., Dina, M.S., Goldsmith, R., Gould, S.E., Guichert, O., Gunzner, J.L., Halladay, J., *et al.* (2009). GDC-0449-a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 5576-5581.
- Robbins, D.J., Nybakken, K.E., Kobayashi, R., Sisson, J.C., Bishop, J.M., and Therond, P.P. (1997). Hedgehog Elicits Signal Transduction by Means of a Large Complex Containing the Kinesin-Related Protein Costal2. *Cell* 90, 225-234.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., and *et al.* (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.
- Rogers, G.C., Rusan, N.M., Roberts, D.M., Peifer, M., and Rogers, S.L. (2009). The SCF Slimb ubiquitin ligase regulates Plk4/Sak levels to block centriole reduplication. *J Cell Biol* 184, 225-239.
- Rohman, M., and Harrison-Lavoie, K.J. (2000). Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins. *Protein Expr Purif* 20, 45-47.
- Rousset, R., Wharton, K.A., Jr., Zimmermann, G., and Scott, M.P. (2002). Zinc-dependent interaction between dishevelled and the Drosophila Wnt antagonist naked cuticle. *J Biol Chem* 277, 49019-49026.
- Rubin, L.L., and de Sauvage, F.J. (2006). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5, 1026-1033.
- Ruel, L., Gallet, A., Raisin, S., Truchi, A., Staccini-Lavenant, L., Cervantes, A., and Therond, P.P. (2007). Phosphorylation of the atypical kinesin Costal2 by the kinase Fused induces the partial disassembly of the Smoothened-Fused-Costal2-Cubitus interruptus complex in Hedgehog signalling. *Development* 134, 3677-3689.
- Ruel, L., Rodriguez, R., Gallet, A., Lavenant-Staccini, L., and Therond, P.P. (2003). Stability and association of Smoothened, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nat Cell Biol* 5, 907-913.
- Scales, S.J., and de Sauvage, F.J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* 30, 303-312.
- Shi, Q., Li, S., Jia, J., and Jiang, J. (2011). The Hedgehog-induced Smoothened conformational switch assembles a signaling complex that activates Fused by promoting its dimerization and phosphorylation. *Development* 138, 4219-4231.
- Sicklick, J.K., Li, Y.X., Jayaraman, A., Kannangai, R., Qi, Y., Vivekanandan, P., Ludlow, J.W., Owzar, K., Chen, W., Torbenson, M.S., and Diehl, A.M. (2006). Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 748-757.

- Sisson, B.E., Ziegenhorn, S.L., and Holmgren, R.A. (2006). Regulation of Ci and Su(fu) nuclear import in *Drosophila*. *Developmental Biology* 294, 258-270.
- Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K., and Scott, M.P. (1997). Costal2, a Novel Kinesin-Related Protein in the Hedgehog Signaling Pathway. *Cell* 90, 235-245.
- Smelkinson, M.G., and Kalderon, D. (2006). Processing of the *Drosophila* Hedgehog Signaling Effector Ci-155 to the Repressor Ci-75 Is Mediated by Direct Binding to the SCF Component Slimb. *Current Biology* 16, 110-116.
- Smelkinson, M.G., Zhou, Q., and Kalderon, D. (2007). Regulation of Ci-SCF/Slimb binding, Ci proteolysis, and hedgehog pathway activity by Ci phosphorylation. *Dev Cell* 13, 481-495.
- So, P.L., Langston, A.W., Daniellina, N., Hebert, J.L., Fujimoto, M.A., Khaimskiy, Y., Aszterbaum, M., and Epstein, E.H., Jr. (2006). Long-term establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors. *Exp Dermatol* 15, 742-750.
- Soleti, R., Benameur, T., Porro, C., Panaro, M.A., Andriantsitohaina, R., and Martinez, M.C. (2009). Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30, 580-588.
- Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S.V., Mynett, A., and Briscoe, J. (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* 19, 626-641.
- Stanton, B.Z., Peng, L.F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J.L., Taveras, K.M., Hyman, J.M., Lee, S.W., Koehler, A.N., *et al.* (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* 5, 154-156.
- Stegman, M.A., Vallance, J.E., Elangovan, G., Sosinski, J., Cheng, Y., and Robbins, D.J. (2000). Identification of a Tetrameric Hedgehog Signaling Complex. *J. Biol. Chem.* 275, 21809-21812.
- Su, V.F., Jones, K.A., Brodsky, M., and The, I. (2007). Quantitative analysis of Hedgehog gradient formation using an inducible expression system. *BMC Dev Biol* 7, 43.
- Sugano, W., Ohno, K., Yoneda-Kato, N., Kato, J.-y., and Yamaguchi, M. (2008). The myeloid leukemia factor interacts with COP9 signalosome subunit 3 in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal* 275, 588-600.
- Sugano, W., and Yamaguchi, M. (2007). Identification of novel nuclear localization signals of *Drosophila* myeloid leukemia factor. *Cell Struct Funct* 32, 163-169.
- Svard, J., Heby-Henricson, K., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergstrom, A., Ericson, J., Toftgard, R., and Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* 10, 187-197.
- Tabata, T., Eaton, S., and Kornberg, T.B. (1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev* 6, 2635-2645.
- Tabata, T., and Kornberg, T.B. (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76, 89-102.
- Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* 418, 892-897.



- Tay, S.Y., Ingham, P.W., and Roy, S. (2005). A homologue of the Drosophila kinesin-like protein Costal2 regulates Hedgehog signal transduction in the vertebrate embryo. *Development* 132, 625-634.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A., and Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59, 971-1005.
- Technikova-Dobrova, Z., Sardanelli, A.M., and Papa, S. (1991). Spectrophotometric determination of functional characteristics of protein kinases with coupled enzymatic assay. *FEBS Lett* 292, 69-72.
- Tenzen, T., Allen, B.L., Cole, F., Kang, J.-S., Krauss, R.S., and McMahon, A.P. (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, 647-656.
- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., *et al.* (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851-856.
- Therond, P.P. (2012). Release and transportation of Hedgehog molecules. *Curr Opin Cell Biol*.
- Theunissen, J.-W., and de Sauvage, F.J. (2009). Paracrine Hedgehog Signaling in Cancer. *Cancer Res* 69, 6007-6010.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Tostar, U., Malm, C.J., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G., Toftgard, R., and Unden, A.B. (2006). Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* 208, 17-25.
- 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. *Eur J Neurosci* 11, 3199-3214.
- Traiffort, E., Moya, K.L., Faure, H., Hassig, R., and Ruat, M. (2001). High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *European Journal of Neuroscience* 14, 839-850.
- Tremblay, M.R., Lescarbeau, A., Grogan, M.J., Tan, E., Lin, G., Austad, B.C., Yu, L.C., Behnke, M.L., Nair, S.J., Hagel, M., *et al.* (2009a). Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926). *J Med Chem* 52, 4400-4418.
- Tremblay, M.R., Nesler, M., Weatherhead, R., and Castro, A.C. (2009b). Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy. *Expert Opin Ther Pat* 19, 1039-1056.
- Tsuboi, K., and Shults, C.W. (2002). Intrastratial injection of sonic hedgehog reduces behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 173, 95-104.
- Tuson, M., He, M., and Anderson, K.V. (2011). Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development* 138, 4921-4930.

- Varjosalo, M., Li, S.P., and Taipale, J. (2006). Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev Cell* *10*, 177-186.
- Vervoort, M., Crozatier, M.I., Valle, D., and Vincent, A. (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Current Biology* *9*, 632-639.
- Wang, G., Amanai, K., Wang, B., and Jiang, J. (2000). Interactions with Costal2 and Suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of Cubitus interruptus. *Genes & Development* *14*, 2893-2905.
- Wang, G., and Jiang, J. (2004). Multiple Cos2/Ci interactions regulate Ci subcellular localization through microtubule dependent and independent mechanisms. *Dev Biol* *268*, 493-505.
- Wang, Q.T., and Holmgren, R.A. (1999). The subcellular localization and activity of *Drosophila* cubitus interruptus are regulated at multiple levels. *Development* *126*, 5097-5106.
- Wang, Y., McMahon, A.P., and Allen, B.L. (2007). Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr Opin Cell Biol*.
- Wang, Y., and Price, M.A. (2008). A unique protection signal in *Cubitus interruptus* prevents its complete proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* *28*, 5555-5568.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., and Baylin, S.B. (2003). Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. *Cell Cycle* *2*, 196-198.
- Wilson, C.W., and Chuang, P.T. (2010). Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development* *137*, 2079-2094.
- Wilson, C.W., Nguyen, C.T., Chen, M.-H., Yang, J.-H., Gacayan, R., Huang, J., Chen, J.-N., and Chuang, P.-T. (2009). Fused has evolved divergent roles in vertebrate Hedgehog signalling and motile ciliogenesis. *Nature*.
- Xia, L., Jia, S., Huang, S., Wang, H., Zhu, Y., Mu, Y., Kan, L., Zheng, W., Wu, D., Li, X., *et al.* (2010). The Fused/Smurf complex controls the fate of *Drosophila* germline stem cells by generating a gradient BMP response. *Cell* *143*, 978-990.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S.-M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.-W., Hynes, M., Goddard, A., *et al.* (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* *391*, 90-92.
- Yang, W.Y., Larios, E., and Gruebele, M. (2003). On the extended beta-conformation propensity of polypeptides at high temperature. *J Am Chem Soc* *125*, 16220-16227.
- Yao, S., Lum, L., and Beachy, P. (2006). The Ihog Cell-Surface Proteins Bind Hedgehog and Mediate Pathway Activation. *Cell* *125*, 343-357.
- Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., *et al.* (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* *455*, 406-410.
- Yavari, A., Nagaraj, R., Owusu-Ansah, E., Follick, A., Ngo, K., Hillman, T., Call, G., Rohatgi, R., Scott, M.P., and Banerjee, U. (2010). Role of lipid metabolism in smoothed derepression in hedgehog signaling. *Dev Cell* *19*, 54-65.

- Yoneda-Kato, N., Look, A.T., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Raimondi, S.C., Cohen, K.J., Carroll, A.J., and Morris, S.W. (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* 12, 265-275.
- Yue, S., Chen, Y., and Cheng, S.Y. (2009). Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 28, 492-499.
- Zeng, W., Wharton, K.A., Jr., Mack, J.A., Wang, K., Gadbow, M., Suyama, K., Klein, P.S., and Scott, M.P. (2000). naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. *Nature* 403, 789-795.
- Zhang, C., Williams, E.H., Guo, Y., Lum, L., and Beachy, P.A. (2004). Extensive phosphorylation of Smoothed in Hedgehog pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17900-17907.
- Zhang, D., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2011). A novel immunity system for bacterial nucleic acid degrading toxins and its recruitment in various eukaryotic and DNA viral systems. *Nucleic Acids Research* 39, 4532-4552.
- Zhang, W., Dunkle, J.A., and Cate, J.H. (2009). Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting. *Science* 325, 1014-1017.
- Zhang, Y., Mao, F., Lu, Y., Wu, W., Zhang, L., and Zhao, Y. (2011). Transduction of the Hedgehog signal through the dimerization of Fused and the nuclear translocation of Cubitus interruptus. *Cell Res.*
- Zhao, Y., Tong, C., and Jiang, J. (2007). Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* 450, 252-258.
- Zhou, Q., and Kalderon, D. (2011). Hedgehog Activates Fused through Phosphorylation to Elicit a Full Spectrum of Pathway Responses. *Dev Cell* 20, 802-814.
- Zhu, A.J., Zheng, L., Suyama, K., and Scott, M.P. (2003). Altered localization of Drosophila Smoothed protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev* 17, 1240-1252.
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757-768.

## ◆ Résumé

La voie de signalisation HH joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaires. Le dérèglement de cette voie est responsable de nombreux cancers. J'ai ainsi mis en place les outils moléculaires nécessaires pour identifier des régions importantes dans les interactions protéines-protéines au sein du complexe intracellulaire de la voie qui vont permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation du facteur de transcription CI en fonction de l'état d'activation de la voie. Mes travaux ouvrent la voie à de nombreuses études structurales et fonctionnelles de ces protéines jusqu'ici peu étudiées.

## ◆ Mots clés

Hedgehog, purification, biophysique, interaction, phosphorylation, kinases.

## ◆ Le nom du laboratoire de rattachement

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales. UPR3082. Campus CNRS Gif-sur-Yvette

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11  
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »  
5, rue Jean Baptiste Clément  
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex