

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE

Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

CNRS UPR4301 - Centre de Biophysique Moléculaire

Equipe « Signalisation cellulaire et neurofibromatose »

THÈSE présentée par :

Elodie VILLALONGA-ROSSO

Soutenue le : 17 juin 2024

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie. Médecine et santé.

Etudes moléculaires des LIM kinases, LIMK1 et LIMK2, protéines impliquées dans le remaniement du cytosquelette : mise en évidence d'un nouveau mécanisme de régulation et développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

THÈSE dirigée par :

Mme VALLEE Béatrice

Chargée de Recherche CNRS, CBM, Orléans

RAPPORTEURS :

M. JAULT Jean-Michel

Directeur de Recherche CNRS, IBCP, Lyon

Mme RUCHAUD Sandrine

Directrice de Recherche CNRS, Station Biologie de Roscoff

JURY :

M. LAFITE Pierre

Professeur des Universités, Université d'Orléans, Président du jury

Mme RIBBA Anne-Sophie

Chargée de Recherche INSERM CNRS, IAB, Grenoble

M. TOUZÉ Antoine

Professeur des Universités, Université de Tours

MEMBRES INVITES :

Mme BENEDETTI Hélène

Directrice de Recherche CNRS, CBM, Orléans

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais adresser mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ces travaux de thèse.

Un grand merci au docteur **Jean-Michel Jault**, de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines de Lyon, et à la docteure **Sandrine Ruchaud**, de la Station Biologie de Roscoff, d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Mes remerciements également à la docteure **Anne-Sophie Ribba**, de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences de Grenoble, et au professeur **Antoine Touzé**, de l'Université de Tours, d'avoir accepté d'examiner mon mémoire. Enfin, je remercie le professeur **Pierre Lafite**, de l'Université d'Orléans, d'avoir accepté de présider ce jury. J'espère de tout cœur que vous avez trouvé la lecture de manuscrit aussi agréable que ce que j'ai eu plaisir à l'écrire.

Mes remerciements aux membres du CIDR qui ont œuvré pour que je puisse soutenir en dépit de circonstances compliquées. Je remercie tout particulièrement la professeure **Caroline West** qui s'est proposée d'examiner ce manuscrit dans des délais extrêmement courts pour permettre cette soutenance dans les temps. Les membres du CIDR, de par leur implication dans le conflit qui a entaché ma fin de thèse, ont finalement permis de faire reconnaître mon travail et de faire prévaloir l'éthique et l'intégrité scientifique sur l'égo et la volonté de nuire. Pour cela, ils ont toute ma reconnaissance.

Mes remerciements à la direction du Centre de Biophysique Moléculaire, le docteur **Matthieu Réfrégiers** et la docteure **Hélène Bénédicti**, pour s'être tenus à mes côtés sur cette dernière année. Votre soutien a été précieux pour garder le cap.

J'adresse mes remerciements aux cheffes de l'équipe « Signalisation Cellulaire et Neurofibromatose », **Hélène Bénédicti** et **Béatrice Vallée-Méheust**, pour m'avoir accueillie dans leur équipe pendant la durée de ma thèse, pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet et pour m'avoir épaulée tout du long de ce parcours parfois semé d'embûches. **Béa**, je ne pourrais jamais te dire combien je te suis reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté. J'ai eu une chance extraordinaire de t'avoir comme directrice de thèse. Tu as été présente pour moi à chaque instant de ces quatre années parfois compliquées. Même depuis l'autre bout du monde, tu m'as accompagnée dans les beaux et les moins beaux moments, tu m'as aidée chaque fois que j'en avais besoin et tu m'as offert la liberté de prendre ma thèse en main quand j'ai été prête à le faire. De ce doctorat, je suis sortie grandie scientifiquement et humainement, et c'est grâce à toi. Merci pour ton soutien infailible, pour ta confiance et pour ta bonne humeur débordante.

Mes remerciements aux autres membres de l'équipe « Signalisation Cellulaire et Neurofibromatose ». **Amandine**, merci d'avoir été présente pour moi dans les moments de joie intense comme dans les moments les plus difficiles. Et merci pour avoir rythmé mes journées par des pauses café et des papotages toujours bienvenus (et parfois carrément nécessaires !). **Christine**, travailler à vos côtés a été un véritable plaisir. Merci pour votre soutien de chaque instant et merci pour nos échanges si intéressants sur le monde, qu'il soit de la Recherche ou non. **Thierry**, merci pour ton soutien et pour nos discussions (ragots !!) qui m'offrent une parenthèse quand j'en ai besoin. **Fabienne**, merci pour ta bonne humeur

et pour ton soutien logistique. **Michel**, merci pour votre expertise en purification des protéines.

J'adresse également mes remerciements aux membres passés de l'équipe « Signalisation Cellulaire et Neurofibromatose ». **Caroline** en premier lieu, qui m'a accompagnée pendant quelques mois sur cette deuxième année de thèse. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta carrière. **Justine**, pour nos échanges au quotidien et pour m'avoir confié son précieux ouvrage « *Le Mariage Pour les Nuls* » que je dois transmettre à mon tour. Finally, I would like to address many thanks to **Bojan**, who shared my office for a few months. Many, many gossips were spoken during those months. But it is a pleasure to chat with you about everything and anything at given time.

J'aimerais adresser mes remerciements à l'équipe « Dérégulation de l'Autophagie lors de l'inflammation due au VIH », aussi connue sous les noms de « DAIV » (pas le chanteur) et surtout « ma première et ma deuxième équipe ». En premier lieu, je veux remercier du fond du cœur la docteure **Lucile Mollet**. **Lucile**, si j'en suis là aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à toi. Sans ton soutien inaltérable et sans ta confiance, je n'aurais jamais pu entreprendre une thèse. Je ne pensais pas en avoir les capacités. C'est toi qui m'as poussée à aller de l'avant, qui m'a montrée que la recherche était ce pourquoi j'étais faite. Merci d'être là pour moi et merci également de m'avoir accordé ta confiance pour cette année d'ATER, où j'ai pu découvrir les bons et moins bons côtés de l'enseignement et me consacrer à la rédaction de ce manuscrit, en sachant que j'allais finalement avoir très peu de temps à accorder à la recherche. Je t'en suis extrêmement reconnaissante, de ça et de bien d'autres choses. Merci pour tout.

Chloé, merci d'avoir été présente à chaque fois que j'avais besoin de souffler (et de râler) un peu et merci pour ces petites discussions du quotidien qui rappellent que la vie ne s'arrête pas aux portes du laboratoire. **Clém**, merci d'être toujours une oreille attentive et compatissante et une formidable attrapeuse de bouquet. Tu accomplis jour après jour un travail extraordinaire en supportant Valentin et je t'en félicite. **Kossi**, merci de savoir toujours me communiquer un peu de ta bonne humeur contagieuse et de ton optimiste. Je vous souhaite tous les deux le meilleur pour la suite.

Un grand merci aux équipes de soutien à la recherche, sans qui ce laboratoire ne tiendrait tout simplement pas debout.

J'aimerais remercier **Fabienne, Stéphane, Thierry, Maryvonne, Flora, Alain, Christophe, Sylvain, François** et bien sûr **Lucile**... En fait, merci à l'ensemble du corps enseignant du Collégium Sciences et Techniques d'Orléans. Citer toutes les personnes qui m'ont apportée les compétences nécessaires pour arriver là où j'en suis aujourd'hui prendrait bien, bien trop de temps. Maintenant que je suis passée de l'autre côté du bureau, je comprends combien ce métier est difficile et combien il est passionnant. Merci de m'avoir accordé votre confiance pour porter à mon tour cette casquette. Merci aussi **Malika** pour ta gentillesse et ton soutien. Un grand merci également à mes collègues ATER à qui je souhaite bien du courage pour la suite de leur carrière. En particulier, un grand merci à **Asma** qui a rendu l'organisation de ce second semestre beaucoup moins difficile. Enfin, merci **Mélanie** et **Lucas** pour m'avoir accompagnée sur le Grand Chelem des travaux pratiques. Tout semble moins insurmontable quand on est bien accompagnée.

J'aimerais également adresser mes remerciements aux personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler. En premier lieu, mes remerciements à la docteure **Samia Aci-Sèche**, dont les résultats offrent de belles perspectives pour la suite de ces travaux. Mes remerciements au docteur **Vincent Aucagne** pour m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien les tests d'activité de ses peptides et pour son aide future à la relecture de ce manuscrit. Comme quoi, la chimie et la biologie peuvent faire de belles choses ensemble ! Je remercie également chaudement le professeur **Antoine Touzé** pour avoir accepté de me recevoir en catastrophe sur les vacances de Noël et de m'apprendre tous les secrets de l'expression protéique en système baculovirus. C'était une formidable expérience qui s'est soldée par des résultats très encourageants. J'aurais réellement aimé pouvoir aller au bout de ce projet qui, je suis sûre, apportera de belles réponses dans le futur. J'aimerais, enfin, accorder des remerciements à la docteure **Rouba Nasreddine**.

Je remercie mes deux étudiantes en Master, **Mélanie** et **Marion**, pour le travail qu'elles ont accompli et pour m'avoir donné une première appréciation de cet enseignement qui m'est si cher. J'en profite pour remercier mes étudiants de Licence qui ont rendu cette année infiniment plus riche que je ne l'aurais jamais imaginé. Tous les messages de remerciement, toutes les marques de soutien qui font au chaud au cœur et qui font se dire que, finalement, c'est quand même un beau métier.

J'aimerais attaquer la dernière partie de ces remerciements en m'adressant aux personnes qui me sont le plus proches. Mes amis, pour commencer. **Docteur Beauvais**, on n'a trop de souvenirs discutables pour que je les étale en public. Les vrais se reconnaissent. Merci d'être toi. **Docteur Thebault** et **Docteur Vergès**, par où commencer ? Je ne sais pas vous dire combien je suis heureuse et reconnaissante de vous avoir dans ma vie depuis toutes ses années. Vous êtes des soutiens indéfectibles, des amis loyaux, des véritables béquilles émotionnelles parfois. Merci pour tout. **Aurélia**, merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Merci pour les fous-rires, les soirées Among Us, les sushis planqués dans le bureau, la pression sur Alexandre pour qu'il daigne m'épouser. Ta petite famille et toi vous me manquez beaucoup. **Pauline, Galaad**, vous êtes des personnes exceptionnelles. Je ne pourrais pas vous dire combien je suis heureuse de vous avoir dans ma vie, de vous avoir pour les moments importants. Merci de votre soutien, merci pour les soirées jeu de société, merci de me partager votre expérience de la parentalité sans tabou. **Florestan**, merci d'être là quand j'ai besoin de relâcher un peu (beaucoup) la pression. Je suis contente qu'on ait réussi à garder le contact malgré la distance. **Léa**, ma Gnou, merci d'être là après toutes ces années et d'être toujours présente pour les moments importants. J'ai hâte de rencontrer ton petit numéro 2 et que tu rencontres mon petit numéro 1.

Mes remerciements à ma famille. **Maman**, si j'en suis là aujourd'hui c'est avant tout grâce à toi. J'ai hérité de ta force, de ton courage et de ta détermination. Tu m'as toujours soutenue, tu t'es battue pour moi quand c'était nécessaire et tu as cru en moi quand personne ne le faisait. Tu m'as aussi appris que les mauvais moments finissent toujours par passer, qu'il faut s'accrocher, se relever et aller de l'avant. Tu m'as appris que la vie est un éternel combat, mais qu'elle est belle et qu'elle vaut la peine qu'on se batte. **Margot**, ma cocotte, merci pour tout. Je suis fière de la belle et intelligente jeune femme que tu es devenue. **Mamie**, merci de t'être occupée de moi pendant toutes ses années. Je suis heureuse que tu te sois rapprochée de nous et, tu verras, ce n'est pas si mal la Sologne. **Tatie**, j'admire ce que tu fais au quotidien. Tu peux être fière de toi. Merci pour tous ces

beaux souvenirs et pour nos discussions qui ont un petit goût de Provence. J'aimerais remercier mes beaux-parents, **Catherine** et **Angelo** qui m'ont accueillie au sein de leur famille comme leur propre fille, qui nous soutiennent depuis toutes ses années et qui sont toujours présents pour nous. Je ne pourrais jamais vous dire combien je me sens chanceuse de vous avoir dans ma vie. Mes remerciements à mes beaux-frères, **Anthony** et **Aurélien**, et à ma belle-sœur, **Anaïs**. Merci d'être là et merci d'être vous. Vous allez faire des supers tontons et tata.

Je garde le meilleur pour la fin. **Alexandre**. Je sou mets ce manuscrit à la veille de notre anniversaire de mariage. C'est cocasse, parce que je pourrais accorder une thèse entière pour te dire combien je t'aime et combien je suis heureuse de t'avoir dans ma vie depuis plus de dix ans. Tu m'as supportée matériellement, financièrement et émotionnellement toutes ces années sans jamais rien demander en retour. Et je sais que ça n'a pas été facile parce que d'abord, j'étais sûre que je n'aurais jamais mes examens de Licence. Puis j'étais sûre que je n'aurais jamais ma place en master. Puis j'étais sûre que je n'aurais jamais de thèse. Tu as toujours réussi à me canaliser, moi, petite boule d'angoisses et à me couvrir d'amour. Tu es mon pilier, mon havre de paix. Je ne pourrais pas imaginer ma vie sans toi. Tu vas faire un papa exceptionnel et j'ai hâte de me lancer dans cette belle aventure avec toi. Je t'aime infiniment.

À **toi**, enfin, que je ne connais pas encore et que je connais déjà si bien. Tu as contribué à rendre cette mauvaise passe beaucoup plus facile, parce que tu m'as fait garder en tête qu'il y a des choses tout simplement plus importantes et qui valent la peine qu'on se concentre dessus. J'ai tellement hâte de t'accueillir dans ma vie.

Ces remerciements sont très longs. À la mesure de ma reconnaissance pour tous ceux qui m'ont accompagnée durant ce long parcours.

Merci à toutes, merci à tous.

« *All's well that ends better.* »

J. R. R. Tolkien

RESUME

Les LIM kinases, LIMK1 et LIMK2 (LIMKs), sont des sérine/thréonine et tyrosine kinases. Elles jouent un rôle crucial dans la dynamique du cytosquelette en inhibant la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine, empêchant ainsi le remodelage des filaments d'actine. Elles participent également au remaniement des microtubules par un mécanisme toujours inconnu à ce jour. De par leur rôle clé dans la dynamique du cytosquelette, les LIM kinases sont impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques mais aussi pathologiques, et constituent donc des cibles thérapeutiques d'intérêt. De nombreux inhibiteurs « petites molécules chimiques » ont été développés contre les LIMKs, mais aucun n'a franchi le cap des essais cliniques. Comprendre le mode d'action de ces kinases d'un point de vue moléculaire pourrait donc permettre de développer de nouvelles stratégies d'inhibition originales, sélectives et efficaces.

Des études antérieures de l'équipe ont suggéré que l'extrémité C-terminale de LIMK2 était nécessaire pour son activité kinase sur la cofiline. Au cours de ma thèse, j'ai démontré qu'un acide aminé de cette région, la tyrosine 630 pour LIMK2 et tyrosine 632 pour LIMK1, joue un rôle clé dans l'activité des LIMKs vis-à-vis de la cofiline. Cette tyrosine est requise pour (i) que les LIMKs phosphorylent la cofiline, (ii) qu'elles induisent la formation de fibres de stress, (iii) qu'elles soient phosphorylées par les kinases en amont sur leur site d'activation canonique, thréonine 505 pour LIMK2 et thréonine 508 pour LIMK1, (iv) qu'elles dimérisent, (v) qu'elles s'autophosphorylent sur un site différent de la thréonine 505/508, (vi) qu'elles soient stables. Ces résultats ont permis de mettre à jour un nouveau mécanisme de régulation des LIMKs : l'activation de ces protéines par phosphorylation de leur thréonine 505/508, tel que décrit dans la littérature, est nécessaire mais pas suffisante pour permettre une activité kinase optimale sur la cofiline. Les LIMKs doivent au préalable dimériser et s'autophosphoryler, un mécanisme médié par leur tyrosine 630/632 dont la nature aromatique est déterminante dans ce phénomène.

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à un projet ayant pour objectif de développer une nouvelle approche thérapeutique vis-à-vis des LIMKs. Cette stratégie est basée sur l'inhibition de l'interaction protéine/protéine (PPI) LIMKs/cofiline par des *stapled peptides*. Les *stapled peptides* sont des petits peptides cyclisés dont la conformation est contrainte en hélice alpha par le pontage covalent des chaînes latérales de deux acides aminés (« agrafe »), ce qui leur confère des propriétés pharmacologiques intéressantes. En

collaboration avec l'équipe « Protéines de Synthèse et Chimie Bioorthogonale » du CBM dirigée par Vincent Aucagne, différents peptides ont été synthétisés et j'ai testé leur capacité à inhiber la phosphorylation de la cofiline par LIMK2. Certains de ces peptides se sont révélés efficaces sur LIMK2 et constituent des inhibiteurs prometteurs pour cibler les LIM kinases. Ces données cruciales ont permis la soumission d'une demande de financement ANR.

L'ensemble des études que j'ai réalisées au cours de ma thèse permet une meilleure compréhension des LIMKs à l'échelle moléculaire, ce qui ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques visant ces kinases qui restent à ce jour difficiles à cibler par des molécules thérapeutiques (*undruggable proteins*).

ABSTRACT

LIM kinases, LIMK1 and LIMK2 (LIMKs), are serine/threonine and tyrosine kinases. They play a crucial role in cytoskeletal dynamics. By inhibiting cofilin, an actin depolymerizing factor, by phosphorylation, LIMKs prevent actin filaments remodelling. LIMK1 and LIMK2 also participate in microtubule turnover, via a mechanism that is currently unknown. Due to their key role in cytoskeletal dynamics, LIM kinases are involved in numerous physiological processes, but also in pathological phenomena. Thus, they have recently emerged as therapeutic targets of interest. Many “small chemical molecule” inhibitors have been developed against LIMKs, but none passed the stage of clinical trials. A better understanding of the mode of action of these kinases from a molecular point of view is therefore required to develop original, selective and efficient inhibition strategies.

Previous studies in our team have suggested that the C-terminus extremity of LIMK2 was essential for its kinase activity on cofilin. During my thesis, I have shown that an amino acid from this extremity, tyrosine 630 for LIMK2 and tyrosine 632 for LIMK1, plays a key role in LIMK activity on cofilin. This tyrosine is required for (i) cofilin phosphorylation by LIMKs, (ii) actin stress fiber formation, (iii) LIMK phosphorylation by upstream kinases on their threonine 505 for LIMK2 and threonine 508 for LIMK1, their canonical activation site, (iv) LIMK dimerization, (v) LIMK autophosphorylation on another site than threonine 505/508, (vi) LIMK stability. Altogether, these results highlight a new mechanism of regulation of LIMKs: the activation of LIMKs by upstream kinases on threonine 505/508 is necessary but not sufficient to have an optimal kinase activity on cofilin. LIMKs have to dimerize and autophosphorylate beforehand. This mechanism is mediated by the tyrosine 630/632, the aromatic nature of this amino acid being critical for this phenomenon.

Furthermore, during my thesis, I took part in another project in order to develop new therapeutical strategies targeting LIMKs. I completed the proof of concept of a new LIMK inhibition strategy based on protein/protein interaction inhibition (PPI) by blocking LIMK/cofilin interaction with stapled peptides. Stapled peptides are small peptides whose conformation is constrained into an alpha helix by a staple, what gives them very interesting pharmacological properties and increases their stability. In collaboration with the CBM team “Synthetic Proteins and Bioorthogonal Chemistry” led by Vincent Aucagne,

several peptides were synthesized and I tested their ability to inhibit cofilin phosphorylation by LIMK2. I showed that some of those peptides are indeed active on LIMK2 and represent promising inhibitors for targeting LIMKs. These results constituted crucial data for the application for an ANR grant.

Overall, the studies that I performed during my thesis allow a better understanding of LIMKs at the molecular level, which opens the way to new therapeutic approaches targeting these kinases, which remain undruggable to this day.

PREAMBULE

Les LIM kinases (LIMKs) sont au cœur d'un vaste réseau d'interactions moléculaires. Elles sont impliquées dans de nombreux processus essentiels à la vie cellulaire, à travers de nombreuses voies de signalisation et jouent notamment un rôle crucial dans la dynamique du cytosquelette en régulant d'une part le remodelage du cytosquelette d'actine et d'autre part en participant au remodelage des microtubules. De multiples études attestent de l'implication des LIM kinases dans des phénomènes pathologiques, comme le cancer, les maladies neurologiques, les neurofibromatoses, ou encore les infections virales, ce qui fait de ces protéines des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes. De nombreux inhibiteurs de type « petites molécules chimiques » ciblant le site actif des LIMKs ont été développés depuis 2008, sans qu'aucun ne passe le stade des essais cliniques. Comprendre le mode d'action et de régulation de ces kinases d'un point de vue moléculaire est aujourd'hui une étape essentielle à la mise au point de thérapies novatrices, sélectives et efficaces pour cibler ces protéines. C'est le constat qui a servi de point de départ à ma thèse.

Ce manuscrit s'articule classiquement en cinq parties :

- L'introduction
- Les objectifs de ma thèse
- Les résultats
- La discussion et les perspectives de ces travaux
- Et enfin, une conclusion générale

L'introduction est subdivisée en trois chapitres. Le premier chapitre est constitué d'une revue que j'ai écrite et qui est centrée sur les LIM kinases et leurs partenaires, en lien avec leurs rôles physiologiques et leurs manifestations pathologiques. Cette revue a été publiée en 2023 dans *Cells* et fait partie d'une édition spéciale dédiée aux LIMKs qui a été coordonnée par ma directrice de thèse. Le chapitre suivant porte sur la Thermophorèse à Micro-Echelle, une technique innovante d'analyse des interactions moléculaires et son application plus particulière à l'étude des interactions entre biomolécules. Enfin, le troisième chapitre aborde l'interaction atypique entre les LIM kinases et leur substrat canonique, la cofiline, qui ouvre la voie à de nouvelles stratégies d'inhibition de ces kinases via l'abolition de cette interaction (*PPI disruption*, *Protein-Protein Interaction Disruption*). Tout particulièrement, les *stapled peptides* constituent une catégorie

d'inhibiteurs de cette interaction protéine-protéine LIMKs-cofiline particulièrement prometteuse.

La partie Résultats de ce manuscrit s'articule autour des deux axes de recherche sur les LIMKs que j'ai développés ou auxquels j'ai participé au cours de ma thèse. La première partie porte sur l'analyse du mécanisme moléculaire régissant l'activité des LIMKs sur la cofiline. Des études antérieures réalisées par des étudiantes de Master 2 avaient suggéré que l'extrémité C-terminale des LIMKs est cruciale pour leur activité kinase sur la cofiline. Au cours de ma thèse, j'ai élucidé le rôle de cette extrémité C-terminale en mettant à jour un résidu-clé de la terminaison carboxyle des LIMKs, la tyrosine 630 pour LIMK2, 632 pour LIMK1, et en décryptant son action. Ces études constituent le cœur de ma thèse et font l'objet d'un manuscrit à soumettre en 2024. En parallèle de ce sujet principal, j'ai aussi participé au développement d'une autre thématique de recherche sur les LIMKs. Le second chapitre des Résultats pose les bases expérimentales de la mise au point d'un nouveau mode d'inhibition de ces kinases en abolissant leur interaction avec la cofiline (*PPI disruption*) via des *stapled peptides*. Enfin, ce manuscrit se conclut par une discussion des résultats et nos perspectives. Une conclusion générale de ces travaux de thèse vient clore le manuscrit.

TABLE DES MATIERES

Table des matières	1
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations.....	6
Introduction	10
I. Les LIMKs, actrices cruciales de la vie cellulaire	10
II. Les stapled peptides, une nouvelle stratégie d'inhibition des LIM kinases.....	51
II.1. Les LIM kinases, des cibles thérapeutiques d'intérêt : développement d'inhibiteurs petites molécules ciblant leur site actif	51
II.2. Une interaction atypique entre les LIMKs et cofiline	56
II.3. Nouvelle stratégie d'inhibition des LIMKs : bloquer leur interaction avec la cofiline via des stapled peptides.	61
II.3.1. Cibler les interactions protéine-protéine.....	61
II.3.2. Historique du développement des stapled peptides.....	63
Objectifs de ma thèse.....	69
Résultats.....	73
I. Mécanismes moléculaires régulant l'activité des LIMKs	73
I.1. Introduction.....	73
I.2. Article.....	73
I.3. Données complémentaires.....	109
I.3.1. Recherche de potentiels sites de phosphorylation de LIMK2 médiés par la tyrosine 630	109
I.3.1.a. Introduction.....	109
I.3.1.b. Matériel et méthodes	110
I.3.1.c. Résultats.....	111
I.3.1.d. Conclusion	112
I.3.2. Expression des domaines kinase de LIMK1 et LIMK2 en système Baculovirus ..	113
I.3.2.a. Introduction.....	113
I.3.2.b. Matériel et méthodes	114
I.3.2.c. Résultats.....	118

I.3.2.d. Conclusion	119
I.4. Conclusion du chapitre I.....	120
II. Développement de <i>stapled peptides</i> en vue d'inhiber spécifiquement l'interaction LIMK/cofiline : une nouvelle stratégie thérapeutique pour cibler la dynamique du cytosquelette	123
II.1. Introduction.....	123
II.2. Matériel et méthodes	125
II.3. Résultats.....	125
II.3.1 Génération des stapled peptides par synthèse sur phase solide (SPPS).....	125
II.3.2 Test de phosphorylation in vitro	131
II.3.3 Analyse de l'hélicité des peptides synthétisés par dichroïsme circulaire	133
II.3.4 Imagerie en microscopie.....	136
II.4. Conclusion du chapitre II	137
<i>Discussion et perspectives</i>	143
<i>Conclusion générale</i>.....	161
<i>Annexes</i>.....	165
Annexe 1 : La Thermophorèse à Micro-Echelle (MicroScale Thermophoresis, MST), un nouvel outil d'analyse des interactions entre biomolécules	165
I. Introduction/Etude bibliographique : La Thermophorèse à Micro-Echelle (MicroScale Thermophoresis, MST), un nouvel outil d'analyse des interactions entre biomolécules	166
I.1. Principe de la thermophorèse, ou effet Soret	166
I.2. La thermophorèse à micro-échelle	167
I.2.1. Principe	167
I.2.2. Analyse du signal MST	169
I.3. Application à l'étude des interactions entre biomolécules	171
I.3.1. Interaction protéine-protéine	172
I.3.2. Interaction protéine-ligand	173
I.3.3. Interaction des acides nucléiques.....	175
II. Résultats.....	177
II.1. Etude des interactions entre les LIMKs et petites molécules inhibitrices par MST	177
II.2. Analyse de l'interaction entre LIMK2 et la cofiline par MST.....	179
II.2.1. Introduction	179

II.2.2. Matériel et méthodes.....	179
II.2.3. Résultats	180
II.2.4. Conclusion.....	185
III. Conclusion de l'Annexe 1	186
Annexe 2 : productions scientifiques	189
Annexe 3 : encadrement de stage et enseignements	191
Annexe 4 : formations suivies au cours de la thèse.....	192
<i>Bibliographie</i>	<i>196</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure des principales molécules développées pour inhiber l'activité des LIM kinases.	55
Figure 2 : Structure des résidus sérine, thréonine, tyrosine.	56
Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires par lesquelles la spécificité enzyme-substrat est obtenue.	57
Figure 4 : Mécanisme d'interaction entre le domaine kinase de LIMK1 et la cofiline.	61
Figure 5 : Les interactions protéine-protéine recouvrent parfois des réalités très différentes.	62
Figure 6 : Représentation schématique de single stapled peptides agencés en i, i+4, i, i+7 et i, i+3.	64
Figure 7 : Représentation schématique des double stapled peptides remote staples, stitched staples, criss-cross staples et nested staples.	66
Figure 8 : Les mutations S283A et T494A n'affectent pas la phosphorylation de LIMK2.	111
Figure 9 : Construction du bacmide contenant l'ADN codant des domaines kinases de LIMK2a sauvage et du mutant LIMK2a-Y630A.	116
Figure 10 : Production des domaines kinases de LIMK2a sauvage et du mutant LIMK2a-Y630A en cellules d'insecte.	119
Figure 11 : Stratégie d'inhibition de l'interaction entre LIMK1 et la cofiline.	124
Figure 12 : Stratégie de synthèse de peptide sur phase solide (SPPS).	126
Figure 13 : Formules des fonctions Boc (à gauche) et Fmoc (à droite).	127
Figure 14 : Design rationnel des stapled peptides selon la séquence native de la cofiline.	128
Figure 15 : Stratégie utilisée pour la synthèse des double stapled peptides.	129
Figure 16 : Huit stapled peptides inhibent efficacement l'activité de LIMK2a sur la cofiline.	132
Figure 17 : Principe du dichroïsme circulaire.	134
Figure 18 : Spectre dichroïque de trois structures secondaires peptidiques.	134
Figure 19 : La mise en place d'une double agrafe augmente l'hélicité du des stapled peptides.	135

Figure 20 : Le peptide FITC-CofiPep 11-1 est capable de passer la barrière membranaire des cellules HeLa. _____	137
Figure 21 : Régulation de la cofiline par LIMK1 et LIMK2, situées en aval des voies de signalisation des GTPases de la famille Rho. _____	144
Figure 22 : Les domaines LIM et les domaines kinases sont capables d'interagir l'un avec l'autre. _____	147
Figure 23 : Représentation 3D de l'extrémité de LIMK2 avec zoom sur la tyrosine 630. _____	150
Figure 24 : La tyrosine 632/630 s'oriente différemment sur les structures de LIMK1 et LIMK2. _____	150
Figure 25 : Représentation 3D de l'extrémité C-terminale des LIMKs avec zoom sur la tyrosine 632/630. _____	151
Figure 26 : L'outil NetPhos permet de faire des prédictions des sites de phosphorylation possibles de LIMK2. _____	152
Figure 27 : Principe de la Thermophorèse à Micro-Echelle (MST). _____	169
Figure 28 : Représentation du signal MST. _____	171
Figure 29 : La MST nécessite une optimisation des conditions expérimentales. _____	182
Figure 30 : La cofiline et LIMK2 interagissent en MST. _____	183
Figure 31 : Une incubation de 30mn suffit pour stabiliser les complexes. _____	184
Figure 32 : Représentation du binding affinity entre LIMK2 et la cofiline. _____	185

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : Détails des plasmides utilisés pour l'étude des sites de phosphorylation T494A, S283A et T505A. _____	110
Table 2 : Amorces et vecteurs utilisés pour la construction des plasmides pour l'étude des sites de phosphorylation T494A, S283A et T505A. _____	111
Table 3 : Détails des plasmides utilisés pour la génération de baculovirus recombinants. _____	118
Table 4 : Amorces et vecteurs utilisés pour la construction des plasmides pFastBac. _____	118
Table 5 : Stapled peptides synthétisés dans le cadre de ce projet de thèse _____	130

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
Acm	S-acetamidomethyl
ADF	Actin depolymerizing factor
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
AURKA	Aurora A kinase
Boc	t-butyloxycarbonyl
CBB	Coomassie brilliant blue
CBM	Centre de Biophysique Moléculaire
CD	Dichroïsme circulaire
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CIN	Chronophin
DFG	Asparagine, phenylalanine, glycine
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F-actin	Filamentous actin
FITC	fluorophore isothiocyanate
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster resonance energy transfer
HA	Hémagglutinine
HCl	Acide chlorhydrique
HEK-293	Human embryonic kidney
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Hsp90	Heat shock protein 90
IC50	Inhibition constant 50
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K_D	Constante de dissociation

kDa	Kilodalton
KO	Knock-out
Larp6	La-related protein 6
LIM	Lin11, Isl-1, Mec-3
LIMK	LIM kinase
MBP	Myelin basic protein
MRCKα	Myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase α
MST	Microscale Thermophoresis
NaF	Fluorure de sodium
NES	Nuclear export signal
NF1	Neurofibromatose de type 1/Neurofibromine
NIR	Near infrared
NLS	Nuclear Localization signal
PAK	P21-activated kinase
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ	PSD95, DigA, ZO-1
pH	Potentiel hydrogène
PKA	Protein kinase A
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PP1	Protein phosphatase 1
PP1i	Protein phosphatase 1 inhibitor
PP2A	Protein phosphatase 2A
PPI	Protein-protein interaction
PROTAC	PROteolysis-TArgeting Chimeras
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROCK	Rho-associated protein kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
Sf21	Spodoptera frugiperda 21
SPPS	Synthèse de peptide en phase solide
SPR	Surface Plasmon Resonance

SSH	Slingshot phosphatase
SVF	Sérum de veau fœtal
tBu	tert-butyl
TFA	Acide trifluoroacétique
TRIS	tris(Hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	ARN de transfert
Trt	S-trytil
UV	Ultraviolet

Introduction

INTRODUCTION

I. Les LIMKs, actrices cruciales de la vie cellulaire

Bien qu'initialement décrites comme prenant part au remaniement du cytosquelette à travers le remodelage des filaments d'actine et des microtubules, les LIM kinases sont en réalité impliquées dans de nombreuses autres voies de signalisation. Dans la revue que j'ai rédigée au cours de ma thèse [1], nous avons détaillé le rôle des LIMKs dans plusieurs processus physiologiques, notamment la migration cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose et la différenciation neuronale. Nous avons également présenté leur rôle dans le développement de pathologies telles que le cancer, les maladies neurologiques, les neurofibromatoses, ou encore les infections virales. Nous avons pris le parti de décrire ces phénomènes et leurs rôles à travers leurs partenaires, ce qui a permis de mettre en évidence que les LIMKs se trouvent au cœur d'un vaste réseau d'interactions protéine-protéine indispensables à la régulation de la vie cellulaire.

La revue « *LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features* » a été publiée dans le journal *Cells*, dans le cadre d'une édition spéciale portant sur les LIM kinases.

Review

LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features

Elodie Villalonga ¹, Christine Mosrin ¹, Thierry Normand ¹, Caroline Girardin ¹, Amandine Serrano ¹, Bojan Žunar ², Michel Doudeau ¹, Fabienne Godin ¹, Hélène Bénédicti ¹ and Béatrice Vallée ^{1,*}

¹ Centre de Biophysique Moléculaire; UPR4301, CNRS, University of Orleans and INSERM, CEDEX 2, 45071 Orleans, France

² Laboratory for Biochemistry, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

* Correspondence: beatrice.vallee@cnrs-orleans.fr; Tel.: +33-(0)2-38-25-76-11

Abstract: LIM kinase 1 (LIMK1) and LIM kinase 2 (LIMK2) are serine/threonine and tyrosine kinases and the only two members of the LIM kinase family. They play a crucial role in the regulation of cytoskeleton dynamics by controlling actin filaments and microtubule turnover, especially through the phosphorylation of cofilin, an actin depolymerising factor. Thus, they are involved in many biological processes, such as cell cycle, cell migration, and neuronal differentiation. Consequently, they are also part of numerous pathological mechanisms, especially in cancer, where their involvement has been reported for a few years and has led to the development of a wide range of inhibitors. LIMK1 and LIMK2 are known to be part of the Rho family GTPase signal transduction pathways, but many more partners have been discovered over the decades, and both LIMKs are suspected to be part of an extended and various range of regulation pathways. In this review, we propose to consider the different molecular mechanisms involving LIM kinases and their associated signalling pathways, and to offer a better understanding of their variety of actions within the physiology and physiopathology of the cell.

Keywords: LIMK; actin dynamics; cytoskeleton remodelling; signalling pathways



Citation: Villalonga, E.; Mosrin, C.; Normand, T.; Girardin, C.; Serrano, A.; Žunar, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Bénédicti, H.; Vallée, B. LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features. *Cells* **2023**, *12*, 805. <https://doi.org/10.3390/cells12050805>

Academic Editor: Arnaud Jacquiel

Received: 30 January 2023

Revised: 28 February 2023

Accepted: 2 March 2023

Published: 4 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In 1994, LIM kinase 1 (LIMK1) was discovered simultaneously by the teams of Mizuno [1] and Bernard [2]. It was then described as the first kinase protein seen to contain LIM domains. The LIM kinase family was extended a year later with the discovery of LIM kinase 2 (LIMK2), which has a shared sequence of nearly 51% with LIMK1. Even though they are closely related, LIM kinases display cell-type-specific expression and different subcellular localisation [3]. LIM kinase expression patterns were first established in 2006 by Sumi and by Acevedo [3,4]: LIMK1 is particularly expressed in the brain, heart, skeleton muscles, kidneys, and lungs [5,6], while LIMK2 is more widely expressed in adult and embryonic tissues [4].

Canonically, LIM kinases act as downstream effectors of the members of the Rho GTPase family, including Rho, Rac and Cdc42, which modulate LIMK activity via their effectors, Rho-associated protein kinases (ROCK), myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK α), and p21-activated kinases (PAK), PAK1, PAK2, and PAK4. LIMK1 and LIMK2 are activated by phosphorylation of Thr508 and Thr505, respectively [7,8].

LIM kinases are involved in cytoskeleton dynamics by independently remodelling both actin filaments and microtubules. Their most extensively described substrates are members of the actin depolymerising factor/cofilin (ADF/cofilin) family: cofilin1 (non-muscle cofilin, or n-cofilin), cofilin2 (muscle cofilin, or m-cofilin), and destrin (also known as actin depolymerising factor, or ADF), usually regrouped under the term cofilin. Cofilin was discovered as the first substrate of LIMK1 and LIMK2 in 1998 [9,10] and 1999 [7],

respectively. Once activated, LIM kinases inactivate the ADF/cofilin proteins by phosphorylating their Ser3, rendering them unable to sever actin polymers and inducing the accumulation of filamentous actin (F-actin), actin stress fibre formation, and impacting cytoskeleton dynamics [7,9,10]. Independently of their activity on the actin cytoskeleton, it has been shown that LIM kinases play a role in microtubule turnover by favouring free tubulin formation [11,12], but the molecular implication of the kinases in this process remains to be elucidated.

As there is growing evidence that LIM kinases are crucial node actors of the cell life fate, in this review, we will recapitulate the role of LIMKs in different cellular events and pathologies, and emphasize the molecular actors involved in these processes.

2. Gene Description and Encoded Proteins

The LIM kinase (LIMK) family of proteins is composed of only two highly related members, LIMK1 and LIMK2, which are encoded by separate genes located on the human chromosomes 7q11.23 and 22q12.2, respectively [13]. There are alternative splicing results in the generation of two *LIMK1* mRNAs: one encodes the full length protein, while the other one results in a truncated protein, missing the beginning of the N-terminal first LIM domain [14]. LIMK2 has three isoforms resulting from this alternative splicing: LIMK2a, LIMK2b, and LIMK2-1 [15,16]. While LIMK2a represents the full-length transcript, LIMK2b lacks half of the first LIM domain. LIMK2-1 differs from its two counterparts with the presence of an extra protein phosphatase 1 inhibitory (PP1i) domain in its C-terminal extremity and a slightly truncated kinase domain [16,17]. A testis-specific LIMK2 isoform, tLIMK2, which lacks LIM domains at the N-terminus due to the usage of a testis-specific alternative initiation exon, is highly expressed in male germ cells and has also been described in mice [18,19].

LIMK1 and LIMK2 have the same domain organisation, with two amino-terminal LIM domains, an adjacent PDZ domain, a serine/proline rich region, and a carboxyl-terminal kinase domain (Figure 1). LIMK1 and LIMK2 share a 50% overall sequence identity, and that percentage reaches 70% in the kinase domain [13,20]. The LIM domains (named for the transcription factors Lin11, Isl1, and Mec-3), each composed of two zinc fingers, could play a role in protein–protein interaction, along with the PDZ domain, as well as in protein-to-DNA interaction. The PDZ domain (named for the post-synaptic density protein 95, *Drosophila* disc large tumour suppressor, and Zonula occludens-1 protein), in addition to its protein–protein interaction function, contains two leucine-rich nuclear export signals (NES) and plays a role in nuclear/cytoplasmic shuttling. The C-terminal extremity of LIMKs contains a nuclear localisation sequence (NLS) that could indicate a preferential localisation in the nucleus [21,22]. It also contains an atypical kinase domain that is able to phosphorylate serine and threonine, as well as tyrosine, due to an unusual consensus sequence (DLNSHN motif) in the subdomain VIB of the catalytic site [13].

The structural aspects of LIMK regulation and pharmacology are more extensively described in the review of Chatterjee et al., which belongs to the Special Issue LIM Kinases: From Molecular to Pathological Features [23].

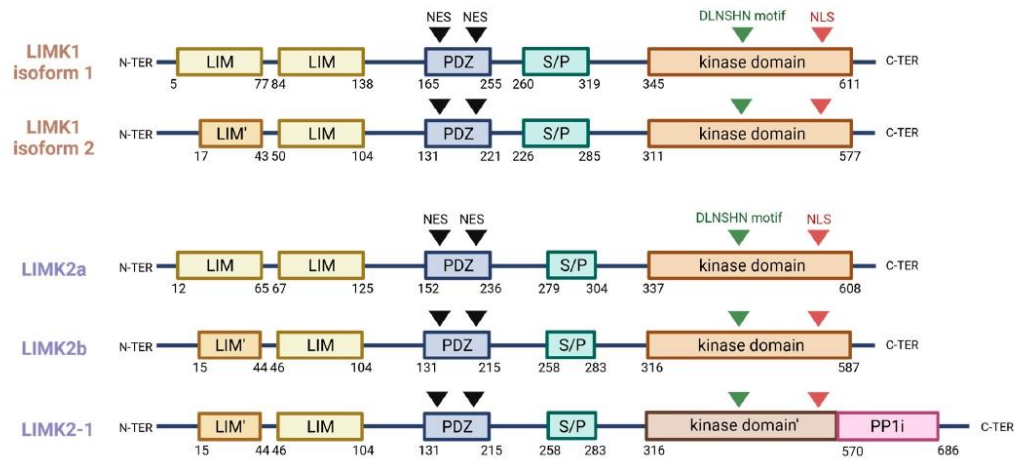


Figure 1. Schematic structures of human LIM kinases, LIMK1, and LIMK2, and their isoforms. Nuclear export signals (NES) are shown with a black arrowhead, DLNSHN motif is shown with a green arrowhead and nuclear localisation signal (NLS) is shown with a red arrowhead, ' stands for truncated domains.

3. Regulation of LIM Kinases—Partner Network

3.1. LIMKs, Downstream Effectors of Small Rho GTPases

LIM kinases were initially identified as kinases that are located downstream of the members of the Rho family of small GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. Canonically, LIMK1 and LIMK2 are activated by p-21 activated kinases (PAK1,2,4), myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK α), and Rho-associated protein kinases (ROCK1 and ROCK2), via the direct phosphorylation of Thr508 and Thr505, respectively. The phosphorylation of LIMKs on their activation loop leads to an activation of their kinase activity, resulting in a higher amount of phosphorylated cofilin on their Ser3, and its subsequent inactivation and cytoskeleton remodelling [7,8] (Figure 2). LIMKs' phosphorylation of cofilin is counteracted by phosphatases dephosphorylating phospho-cofilin: SSH (slingshot phosphatases), PP1 (protein phosphatase 1), PP2A (protein phosphatase 2A), and CIN (chronophin).

3.2. Other Activators of LIMKs

Other activators of LIMK activity have been reported. They were extensively described in the review of Manetti [20], and we will proceed with an exhaustive update (Figures 3 and 4).

Protein kinase A (PKA) phosphorylates LIMK1 at Ser596, and, to a lesser extent, at Ser323. As Ser596 is not conserved in LIMK2, it may play a role in the distinct regulation of LIMK1 and LIMK2. Ser596 phosphorylation with PKA increases the LIMK1 kinase activity on cofilin and induces actin cytoskeleton remodelling [24].

Upon VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) activation, p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) phosphorylates LIMK1 on its Ser310 without affecting its kinase activity on cofilin. MK2, a MAPKAPK-2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2) and a downstream kinase of p38-MAPK, also phosphorylates LIMK1, but on its Ser323, leading to an increase in its kinase activity on cofilin [25].

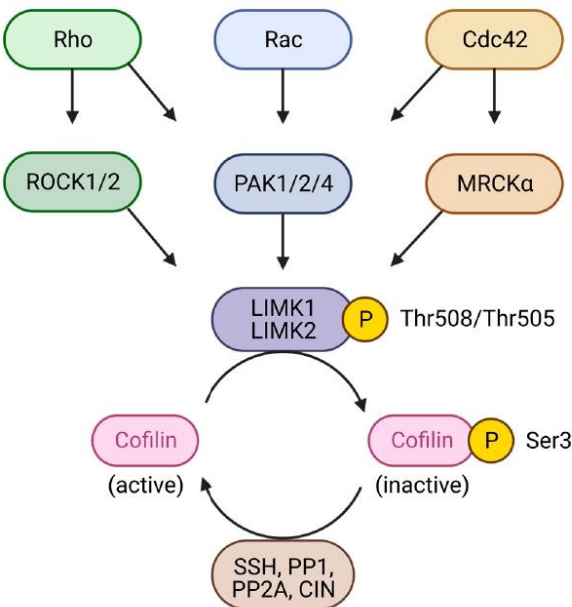


Figure 2. Cofilin regulation by LIM kinases, downstream of Rho GTPase family signalling pathways.

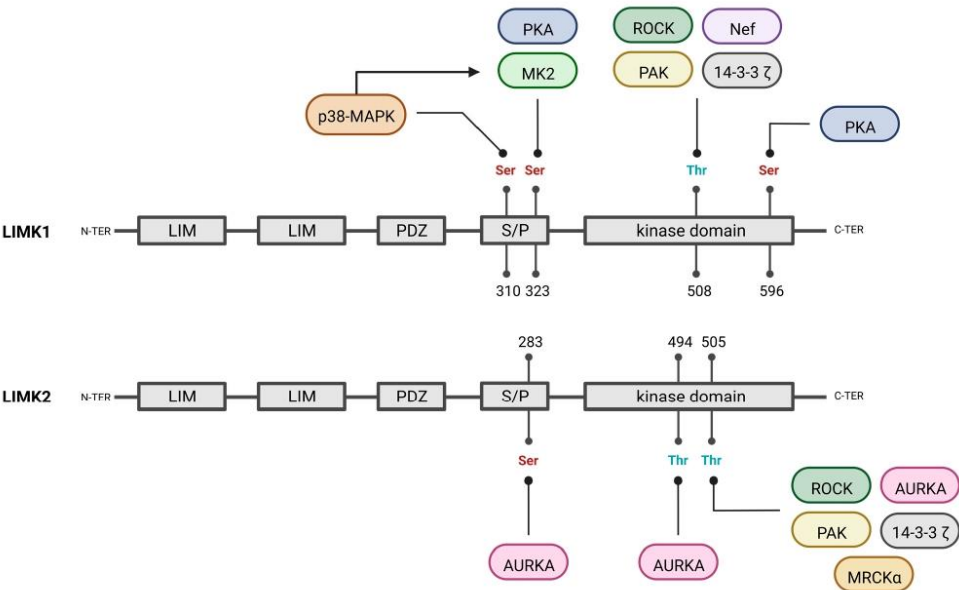


Figure 3. LIM kinase known phosphorylation sites and the kinases involved in these processes.

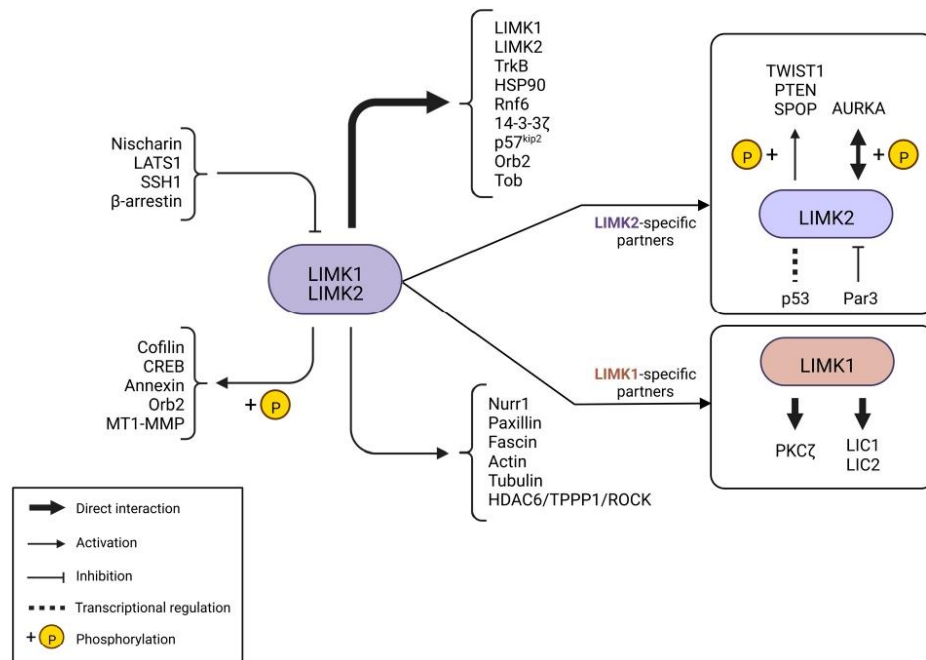


Figure 4. Partners of LIM kinases.

Upon DNA damage, p53 upregulates LIMK2 expression via its binding to an intronic consensus p53 binding site of LIMK2. p53 is a transcription factor that regulates the transcription of various genes that are implicated in cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis, upon DNA damages [26]. This regulation is LIMK2-isoform-dependent, as LIMK2b and LIMK2-1, but not LIMK2a, are upregulated, and leads to G2/M arrest via a cofilin phosphorylation increase [26,27].

Birkenfeld et al. have shown an interaction between LIMK1 and 14-3-3ζ, a member of the 14-3-3 protein family that is involved in cell signalling, cycle control, and apoptotic death, via yeast two-hybrid screening and GST pull-down experiments [28]. 14-3-3ζ also interacts with cofilin. 14-3-3ζ was shown to preferentially interact with the phosphorylated form of cofilin and to protect it from phosphatases, thus prolonging its inactivation [29].

An interaction between LIMK1, but not LIMK2, and p57^{Kip2} (cyclin-dependant kinase inhibitor) was shown through co-immunoprecipitation experiments [30,31]. This interaction is independent of p57^{Kip2} activity and not mediated by ROCK activation. LIMK1–p57^{Kip2} interaction leads to an increase in cofilin phosphorylation and to actin cytoskeleton remodelling.

LIMK1 was shown to autophosphorylate [6]. This autophosphorylation is rather a transphosphorylation, as it was shown to be promoted by homodimerization that was mediated by Hsp90. Indeed, interactions between LIMK1 and Hsp90, as well as between LIMK2 and Hsp90, were detected via co-immunoprecipitation experiments. A proline plays a crucial role in this interaction. The transphosphorylation of LIMK results in its stabilization and highly increases its lifespan.

Upon BDNF (brain-derived neurotrophic factor) stimulation, TrkB (Tropomyosin-related kinase B, a tyrosine kinase receptor) was shown to dimerize, leading to LIMK1 dimerization, transphosphorylation, and stabilisation, with a re-localisation from cytoplasm to membrane, resulting in an increased level of phospho-cofilin. TrkB and LIMK1 were

shown to interact together by yeast two-hybrid screening and by co-immunoprecipitation experiments. TrkB kinase activity is not required to induce LIMK1 dimerization. LIMK1 was also shown to interact with TrkA and TrkC, two TrkB homologues [32].

LIMK2 activation by Aurora kinase A (AURKA) has also been reported [33]. As AURKA is well known for its implication in cancer development, its role in LIMK2 activation will be more extensively discussed in the breast cancer subsection.

3.3. Negative Regulators of LIMKs

LIM kinase activity is finely up- but also down-regulated, and several proteins are able to negatively regulate this (Figure 4).

Nischarin, a protein involved in intracellular signalling, forms a complex with PAK and LIMK1. Nischarin was shown to interact specifically with the phosphorylated form of LIMK1 on Thr508 via co-immunoprecipitation experiments, leading to its dephosphorylation and inhibition, and resulting in lower amounts of phospho-cofilin and impaired cancer cell invasion [34]. Nischarin acts synergistically with LKB1 (liver kinase B1) to decrease the phosphorylation of PAK, LIMK, and cofilin, reducing stress fibres and inhibiting cell migration and invasion [35].

LATS1 (large tumour suppressor kinase 1) was shown to interact with LIMK1 by co-immunoprecipitation experiments, leading to a lower amount of phosphorylated cofilin. LATS1 and LIMK1 co-localise at the actomyosin contractile ring. The inhibition of LIMK1 by LATS1 reverts the LIMK1-induced cytokinesis defects [36].

Slingshot phosphatase (SSH, also known as SSH-1 or SSH1), initially described as cofilin phosphatase, also dephosphorylates and inactivates LIMK1 and LIMK2. SSH was shown to interact with LIMKs by co-immunoprecipitation experiments, and neither the catalytic activity of LIMK2, nor that of SSH, are required for this interaction. SSH dephosphorylates LIMK1 on Thr508, but also on trans/auto-phosphorylated residues, leading to decreased cofilin phosphorylation. A complex SSH1/LIMK1/Actin/14-3-3 ζ was identified, and PAK4 was shown to interact with SSH1, leading to its phosphorylation and inhibition [37].

Upon PAR-2 (protease activated receptor) activation, a complex between the scaffold β -arrestin, cofilin, chronophin, and LIMK is formed, leading to cofilin dephosphorylation and actin filament severing. The proteins β -arrestin-1 and 2 were shown to interact with LIMK through co-immunoprecipitation experiments. The PAR-2 inhibition of the LIMK activity towards cofilin requires β -arrestin and triggers the LIMK re-localisation to membrane protrusions [38].

The RING finger E3 ubiquitin ligase (Rnf6) is highly expressed in the axons of developing neurons during mouse embryogenesis, and can influence the axon outgrowth of cultured hippocampal neurons. Rnf6 binds to and catalyses the polyubiquitination of LIMK1, which leads to its degradation by the proteasome in growth cones. An interaction between Rnf6 and LIMK1 was shown by co-immunoprecipitation experiments. In the presence of Rnf6, the LIMK1 lifespan is reduced 5-fold (4 h vs. 20 h) [39].

Par-3, a member of the polarity proteins involved in the formation of tight junctions, was shown to inhibit LIMK2, but not LIMK1. Par-3 was shown to interact with LIMK2 by co-immunoprecipitation, leading to its inhibition, as phospho-cofilin levels were strongly reduced in its presence [40].

3.4. Other Partners of LIMKs

LIMKs were also shown to interact with other proteins without phosphorylating them (Figure 4).

The orphan nuclear receptor Nurr1 was shown to interact with LIMK1 via GST pull-down. LIMK1 inhibits the Nurr1 transcriptional activity, but the molecular requirements of this inhibition have not been elucidated [41].

LIMK1 was also shown to interact with paxillin, but not with vinculin, through co-immunoprecipitation experiments, although it colocalizes with actin, paxillin, and vinculin at the focal adhesions in fibroblasts [5].

Fascin-1, an actin crosslinking protein, was shown to interact with LIMK1 and LIMK2 by FRET and co-immunoprecipitation experiments. The LIMK phosphorylation by ROCK on Thr505 and Thr508 is required for this interaction, but LIMK kinase activity is not [42].

LIM kinases were also shown to play a pivotal role in the coordination of microtubules and actin filament dynamics. They interact with both actin and tubulin. The ROCK phosphorylation of LIMK1 increases its interaction with actin, whereas it decreases its interaction with tubulin, as was shown by co-immunoprecipitation experiments [11]. LIMK1 overexpression leads to microtubule destabilisation, and its kinase activity is required for this process. LIMK1 was initially thought to phosphorylate TPPP1 (tubulin polymerisation promoting protein 1), but it was then shown that TPPP1 was the substrate of ROCK [43]. Actually, a trimeric complex between LIMK1, TPPP1, and HDAC6 (histone deacetylase 6) was identified. ROCK inhibition stabilises this complex, whereas its activation dissociates it. This trimeric complex leads to HDAC6 inhibition and a subsequent increase in microtubule Lys40 acetylation, which renders microtubules more resilient to mechanical breaks, leading to longer-lived MT [44]. On the contrary, it decreases the cofilin phosphorylation level, resulting in the destabilisation of actin stress fibres. LIMK overexpression leads to tubulin acetylation and microtubule stabilisation, whereas TPPP1 overexpression leads to lower levels of phosphorylated cofilin and stress fibre disruption [45].

4. LIMK Substrates

Cofilin was the first substrate of LIMK that was identified [9,10]. The other substrates of LIMKs have been described since then (Figure 4).

The transcription factor cAMP-responsive element binding protein (CREB), a transcription factor that regulates the genes responsible for cell proliferation, differentiation, and survival, is phosphorylated by LIMK1 on its Ser133. An LIMK1–CREB interaction was shown via co-immunoprecipitation experiments [46].

Upon VEGF activation, LIMK1 phosphorylates annexin 1, a calcium- and phospholipid-binding protein, in an in vitro assay (³²P labelling). This interaction is thought to regulate endothelial cell migration upon VEGF stimulation [47].

A trimeric complex between LIMK, Orb2, and Tob was also described. *Drosophila* Orb2 belongs to the cytoplasmic polyadenylation element binding proteins (CPEB), and binds RNA and regulates translation. Tob (transducer of Erb-B2) is known to induce Orb2 oligomerisation. More recently, it was shown that LIMK phosphorylates Tob, then associates with Tob to phosphorylate Orb2, leading to its stabilisation and oligomerisation. Orb2 oligomerisation plays a major role in long-term memory [48].

The membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP14) interacts with LIMK1 and LIMK2 in co-immunoprecipitation experiments, which triggers its phosphorylation on Tyr573. This phosphorylation leads to MT1-MMP-positive endosome association with cortactin, an f-actin binding protein, resulting in invadopodia formation and matrix degradation. LIMK1 and LIMK2 seem to play different roles in this process, as LIMK1 is involved in the cortactin association with MT1-MMP in positive endosomes, while LIMK2 is implicated in invadopodia-associated cortactin [49].

5. LIMK Physiological Functions

As cytoskeleton remodelling plays a vital role in the life of the cell, LIM kinases are involved in several physiological processes, including cell migration, cell cycle, apoptosis, and neuronal differentiation, which will be developed in the following paragraphs.

5.1. Cell Migration

Cell migration is essential to numerous physiological processes, such as embryogenesis, neuronal development, immune response, and wound repair. Cell morphogenesis

during migration requires the fine spatiotemporal remodelling of the cytoskeleton and can be divided into four steps: (i) the protrusion of the leading edge of the cell (filopodia and lamellipodia, resulting from cytoskeleton polymerisation), (ii) the attachment of the cell front via focal adhesions (FA), (iii) the contraction of the whole-cell body through the interaction between myosin and actin in FA-anchored stress fibres, and (iv) the detachment and retraction of the rear by FA disassembly [50]. The implication of the Rho family of small GTPases in cell migration is well documented [51–53]. As they are the downstream effectors of small Rho GTPases, LIMKs play a role in this process. Moreover, the initial characterisation of LIMKs as kinases that phosphorylate cofilin pointed out their role in actin cytoskeleton dynamics and cell migration [9,10]. The involvement of LIMKs in microtubule remodelling is another way for them to be involved in cell migration [11].

The role of LIMKs in the polarised migration of immune cells upon chemokine stimulation, i.e., chemotaxis, was particularly emphasized. Indeed, LIM kinases and SSH-1 appear to play a key role in the cofilin-driven assembly and disassembly of protrusions [54,55]. Nishita et al. showed that, upon LIM kinase knockdown, lamellipodium and cell migration are suppressed, while SSH-1-KD cells display an impaired directional cell migration. These authors defined that LIMK1 worked synergistically with SSH-1 to assure the deactivation of cofilin at the leading edge of the chemokine-stimulated Jurkat T cells. At the rear, the activation of cofilin allows for the renewal of G-actin for the actin polymerisation in protrusions [54,55]. LIMK1 is required for cell migration by stimulating the lamellipodium formation in the first stages of the cell response, whereas SSH1 restricts this migration to one direction. Rac activation is required for the LIMK1-mediated SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) chemotactic response, but not Rho or Cdc42 [56]. Upon EGF stimulation, LIMK1 was also shown to be involved in actin nucleation at the leading edge and the subsequent lamellipod extension in the metastatic adenocarcinoma cell line [57].

Two other partners of LIMKs were shown to play a role in LIMK-induced cell migration. In response to VEGF, MAPK/MK2/LIMK1 pathway activation leads to annexin 1 phosphorylation and activation, which triggers endothelial cell migration and tubulogenesis. LIMK1 was shown to directly phosphorylate annexin 1 in an [γ^{32} P]-ATP labelling on LIMK1 immunoprecipitation, upon VEGF stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). p38-MAPK is required for this phosphorylation [47]. Fascin-1, an actin crosslinking protein that plays a role in the assembly of cell protrusions, is also associated with a complex of activated LIM kinases, promoting filopodia stabilisation. Indeed, LIMK1/fascin-1 interaction was shown by FRET and FLIM experiments, as well as by His pulldown. LIMK1 activation via ROCK is required for this interaction and for the subsequent filopodia formation and stability [42,56]. Finally, cell migration is dysregulated in cancer, and LIM kinases have been associated with higher tumour invasion properties and metastasis, indicating that the dysregulation of LIMK-mediated cell migration can lead to tumorigenesis [58–61]. Indeed, many inhibitors targeting LIMK activity have been shown to affect cell migration, as it is described in Berabez et al.'s review, published in the Special Issue LIM Kinases: From Molecular to Pathological Features [62].

5.2. Cell Cycle

Cell division is a complex and highly regulated mechanism that requires the fine remodelling of actin filaments and microtubules [63]. As main regulators of cytoskeleton dynamics, LIM kinases are involved in this process. LIMK localisation was extensively studied during the cell cycle and it was shown that LIMKs display different cellular localisation, depending of the stage of the cell cycle of HeLa cells [3]. During interphase and prophase, LIMK1 is associated with cell–cell adhesion sites and re-localises at the spindle poles during metaphase [3]. It disappears from these regions during late anaphase and redistributes at the contractile ring and cleavage furrow during telophase/cytokinesis. During interphase, LIMK2 is diffused throughout the cytoplasm. It re-localises at the spindle pole during prophase and redistributes at the mitotic spindles during metaphase and early anaphase along the spindle microtubules. As the cells progress through late

anaphase and telophase, the LIMK2 localises at the spindle midzone, where it was seen to co-localise with microtubules [3]. These observations indicate that LIMK1 and LIMK2 might play different roles during the course of the cell cycle.

LIMK localisation during mitosis was also studied on other cell lines: LIMKs are located at the centrosomes and at the cleavage furrow of MDA-MB-231 breast cancer cells and DU145 prostate cancer cells. Phospho-LIMK, but not LIMK, co-localises with gamma-tubulin in centrosomes. An interaction between phospho-LIMK, but not LIMK, and gamma-tubulin, was detected by co-IP on crude nuclear extracts [64]. SSH1 localisation was also determined in HeLa cells during mitosis. It appears at the actin cortex during metaphase and redistributes at the cleavage furrow during anaphase and telophase [65]. The similar localisation of SSH1 and LIMKs suggests a fine regulation of cofilin phosphorylation/dephosphorylation, and thus, the inactivation/activation progresses through the cell cycle and actin filament remodelling. Furthermore, different studies have shown the transient activation of these proteins along the cell cycle progression [3,66,67]. In synchronised HeLa cells, LIMK1 is hyperphosphorylated and activated during prometaphase and metaphase, gradually returning to the basal levels of the phosphorylation and activity in telophase and during cytokinesis. As for LIMK, cofilin phosphorylation is increased during prometaphase and metaphase, with a gradual return to basal levels during telophase and cytokinesis, indicating that the LIMK1 hyperphosphorylation activated its kinase activity towards cofilin [67]. The activity of LIMK2 did not change after the cells were released from an S phase cell cycle block. However, when the cells were treated with nocodazole or taxol to disrupt the microtubules and induce an M-phase block, LIMK2 was activated, suggesting that LIMK2 might be responsive to a spindle checkpoint [3]. The SSH1 activity decreased during early mitosis and returned to basal levels during telophase and cytokinesis, resulting in cofilin dephosphorylation and activation [65]. LIMK2 hyperphosphorylation during the early stages of mitosis was also observed, but to a lesser extent than that of LIMK1 (1.8-fold versus 6.4). This hyperphosphorylation leads to the enhanced phosphorylation of cofilin. This activation seems to be mediated via the LIM/PDZ domains of LIMK1, as no increased activity on the cofilin by the restricted kinase domain of LIMK1 was observed. Furthermore, LIMK1-Thr508 phosphorylation is required for this process, but not via ROCK or PAK activation [67]. This activation may occur via cyclin-dependent kinase (Cdk), as it is eliminated in the presence of roscovitine, a Cdk inhibitor [66].

LIMK misexpression leads to an aberrant cell cycle progression. Indeed, the inhibition of the LIMK1 activity during mitosis leads to a delay in mitotic progression (metaphase to anaphase) and irregular spindle positioning [68–70]. On the contrary, the overexpression of LIMK1 or a phosphatase-inactive SSH1 results in increased levels of phosphorylated cofilin and the production of multi-nucleated cells [67]. Upon ROCK activation in NIH-3T3 mouse fibroblasts, LIMK2, but not LIMK1, induces cyclin A expression and decreases p27^{Kip1} expression, which is a Cdk inhibitor, thus regulating the progression through the G1 to S phase. p57^{Kip1}, another Cdk inhibitor, was shown to interact with LIMK1, but not LIMK2, by co-immunoprecipitation on HeLa cells. It directly promotes LIMK1 phosphorylation, but not on Thr508, and without going through ROCK. Furthermore, the Cdk inhibitory activity of p57^{Kip2} is not required for its LIMK-mediated kinase activation on cofilin. Therefore, this cell cycle progression control by p57^{Kip2} occurs via its direct activation of LIMK1 [30].

Furthermore, LIMK1, but not LIMK2, was shown to interact with LIC1 and LIC2 (dynein light chain) via its kinase domain, through co-immunoprecipitation. LIMK1 promotes LIC1 and LIC2 phosphorylation on tyrosine residues. LIC1 and LIC2 are two subunits of the huge complex that forms the cytoplasmic dynein 1 motor, and defines the cargo specificity of dynein. LIMK1 seems to affect dynein motor function, as the kinase dead mutant of LIMK1, D460A, reduces the speed of PLK1 trafficking (a cargo of the dynein motor). Furthermore, LIC1 and LIC2 rescued the aberrant cell cycle progression induced by LIMK1 depletion (multipolar spindle, centrosome spread length, and spindle pole density). LIMK1 could regulate the trafficking of pericentriolar proteins by dynein cargo transportation via LIC1 and LIC2 phosphorylation [69].

5.3. Apoptosis

Apoptosis is a mechanism of tightly regulated programmed cell death, and an essential process in development and cell homeostasis. Apoptosis may be induced by extrinsic stimuli (death receptor pathway) or intrinsic stimuli (mitochondrial pathway), leading to caspase proteolytic pathway activation [71]. A drastic change in cell morphology occurs during apoptosis: shrinkage, bleb formation, and rounding-up. The actin cytoskeleton has been linked to these apoptotic phenotypes [72].

Fas receptor, also known as Fas, FasR, apoptosis antigen 1 (APO-1 or APT), cluster of differentiation 95 (CD95), or tumour necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNFRSF6), is a cell death surface receptor. The treatment of Jurkat and HeLa cells with an anti-Fas antibody leads to the cleavage and activation of LIMK1. The produced LIMK1 N-terminally truncated fragments are constitutively active and stimulate membrane blebbing when they are overexpressed, ultimately leading to cell death. The pre-treatment of cells with benzyloxycarbonyl-Asp(OCH₃)-Glu(OCH₃)-Val-Asp(OCH₃)-fluoromethylketone (z-DEVD-fmk), an inhibitor for caspase-3 or related proteases, blocked the appearance of these LIMK1 fragments, as well as LIMK1 activation, suggesting that the cleavage of LIMK1 is mediated by these caspases. Indeed, LIMK1 is cleaved at a short motif DEID within the PDZ domain, more precisely at aspartic acid 240, while the caspase-3 and related proteins cleave the protein at a DEXD site. Interestingly, LIMK2 does not possess the DEID motif, suggesting that the cleavage-mediated LIMK activation is LIMK1-specific. Moreover, LIMK1 silencing using siRNA partially suppresses membrane blebbing. The caspase-mediated specific cleavage and activation of LIMK1 might play a decisive role in the membrane bleb formation during apoptosis [73].

Apoptosis is induced in the prostate cancer cells LNCaP (hormone sensitive), as well as in DU145 (hormone insensitive), when stimulated with membrane androgen receptor agonist testosterone-BSA (a non-permeable steroid albumin conjugate). In these conditions, Rho, ROCK, and LIMK2 are activated. LIMK2 immunoprecipitated extracts from the testosterone-BSA-treated DU145 exhibit a higher kinase activity compared to untreated cells, with an increase in phospho-LIMK and phospho-destrine by [γ -³²P]-ATP labelling. This increase, as well as apoptosis induction, is lost when cells are pre-treated with the ROCK inhibitor Y27632 [74].

Apoptosis is also induced in the colon cell line HCT116 upon tumour necrosis factor (TNF) treatment. In these conditions, an increase in LIMK phosphorylation on its Thr508 and the subsequent phosphorylation of cofilin are observed. Death-associated protein kinase (DAPK), a protein implicated in programmed cell death, could act as a scaffold protein for the LIMK/cofilin complex in TNF-induced apoptosis. The DAPK/LIMK/cofilin complex is abrogated once the cells are committed to apoptosis [75]. Indeed, LIMK and cofilin are co-immunoprecipitated with DAPK in extracts from the cells treated with TNF. Thus, DAPK promotes a closer interaction between LIMK and cofilin, resulting in a higher phosphorylation of cofilin by LIMK. DAPK kinase activity is required for this increase, as it is lost when the cells are pre-treated with a DAPK inhibitor. Furthermore, TNF induces the re-localisation of the DAPK/LIMK/cofilin complex in the perinuclear compartment.

p57^{Kip2} has been shown to enhance mitochondrial-mediated apoptosis via the activation of LIMK1 and the stabilisation of the actin cytoskeleton. It has been shown to interact with LIMK1, leading to LIMK1 activation in HeLa cells [30]. Apoptosis triggered by staurosporine, an alkaloid with antibiotic properties, is mediated by LIMK1 in the HeLa cells overexpressing p57^{Kip2}. Indeed, in these conditions, the silencing of LIMK1 leads to a decrease in apoptotic nuclei, Cas3 activity, and PARP cleavage. Furthermore, hexokinase-1, an inhibitor of the mitochondrial voltage-dependent anion channel, is displaced from mitochondria, inducing mitochondrial depolarisation and apoptotic cell death [76].

Upon a genotoxic stress, increases in RhoGTP, phospho-LIMK, and phospho-cofilin are observed, as well as cytoskeleton rearrangement with cell flattening and enhanced stress fibres. An increase in LIMK2-1 and LIMK2b, but not LIMK2a, at the protein and mRNA levels is also observed, requiring p53 transcriptional activity and leading to cell survival.

LIMK2 inhibition was shown to sensitise cells to DNA-damage-induced apoptosis [27]. Hence, the LIMK inhibitors associated with genotoxic compounds could constitute an efficient alternative therapy to treat the cancer cells that are resistant to chemotherapy. Indeed, LIMK2 has been shown to be mis-regulated in these resistant cells [12,77].

LIMK2 is also involved in a particular form of neuronal cell death (necrosis) that results from status epilepticus (SE). SE is defined by a single long-lasting or multiple successive life-threatening seizures. Kim et al. have shown that the neuronal death in rat CA1 neurons is driven by a cyclin D1-CDK4 complex upon SE, and that this complex leads to the overexpression of LIMK2. When overexpressed, the LIMK2 impairs dynamic-related protein-1 (DRP1)-mediated mitochondrial fission by stabilising F-actin and preventing DRP1-actin interaction. Thus, it induces mitochondrial elongation and neurotoxicity. LIMK2 silencing via siRNA prevents the downregulation of the DRP1 and mitochondrial elongation induced by SE [78]. These authors further elucidated the stimulus leading to this LIMK2-mediated neuronal necrosis in an SE context. ET-1, a vasoactive peptide produced by vascular endothelium, and its brain receptor ET_B, are rapidly increased upon SE. BQ788, an ET_B antagonist, diminished the SE-induced neuronal damage via the alleviation of ROCK1 upregulation and a reduction in the LIMK2 protein and mRNA expression [79]. A TE-1 injection into the hippocampus of a normal rat leads to an increase in the LIMK2 mediated by ET_B, as well as in mitochondria elongation and sphere formation, confirming the data obtained upon SE.

5.4. Neurodevelopment and Synaptic Plasticity

LIMKs have been shown to play a crucial role during development. Ribba et al. notably focus on embryonic development in their review, which was published in the Special Issue LIM Kinases: From Molecular to Pathological Features [80]. Here, we choose to concentrate on neurodevelopment, synaptic plasticity, memory, and brain functions, as they are among the most well described functions of LIM kinases, along with their function in cytoskeleton remodelling. These features have been extensively detailed in several exhaustive reviews [81–83]. We will focus on the most striking data, especially that in KO mouse models.

Very quickly after their discovery, the implication of LIMKs in neurodevelopment was pointed out in knockout (KO) mice. Indeed, LIMK1 seems to be involved in dendritic spine regulation, because LIMK1 KO mice neurons exhibit abnormal dendritic spines, which are longer, thinner, and immature. Accordingly, the spine heads of these LIMK1 KO neurons display a reduced amount of actin filaments, indicating that LIMK1 plays a critical role in spine morphology through actin filament remodelling. Indeed, the phospho-cofilin levels were higher in LIMK1 KO mice neurons [84]. LIMK2 also seems to play a role in spine regulation. Although LIMK2 KO mice have mild synaptic dysfunction, LIMK1 and LIMK2 double KO mice exhibited aggravated effects compared to that of the LIMK1 KO on the synaptic function, suggesting that there might be a compensatory mechanism upon the loss of LIMK1 or LIMK2 [85]. Several studies suggest that PAKs, as well as ROCK2, could be the upstream activators of LIMKs, with regard to their function in spine regulation [86–88].

There is evidence that LIM kinases also play a role in long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), two mechanisms that underlie synaptic plasticity, learning, and memory processes. Meng et al. showed that LIMK1 KO mice exhibited enhanced hippocampal LTP, as well as altered fear responses and spatial learning. F-actin depolymerising toxins increased the early-phase LTP (E-LTP) in wild-type mice, an effect that was abolished in the LIMK1 KO mice, suggesting that the role of LIMK1 on E-LTP is mediated by the actin cytoskeleton [84]. In 2015, Todorovski et al. showed that LIMK1 KO mice were drastically impaired in long-term memory (LTM) but not short-term memory (STM), and were defective in late-phase long-term potentiation (L-LTP), a form of long-lasting synaptic plasticity that is specifically required for the formation of LTM. They also showed that L-LTP-deficient mice were rescued by a pharmacological increase in the cAMP response element binding protein (CREB) activity [89]. CREB, as a transcription factor that regulates

the genes responsible for cell proliferation, differentiation, and survival, is critical for LIM establishment. LIMK1 and CREB were shown to interact by two-hybrid screening and co-IP experiments, as well as in different parts of the brain [46], and LIMK1 has been shown to phosphorylate CREB [89].

5.5. Membrane Trafficking

Membrane trafficking is a complex process that allows for the delivery of specific cargo (proteins and macromolecules) via transport vesicles towards the dedicated location. LIMK1 has been shown to be involved in membrane trafficking from the Golgi apparatus.

Rosso et al. showed that LIMK1 is enriched in the Golgi apparatus of developing neurons, with its LIM domain triggering this localisation. LIMK1 seems to regulate Golgi dynamics, as it is involved in the tubule-vesicular process. Indeed, when overexpressed, LIMK1 abrogates the formation of trans-Golgi-derived tubules and prevents cytochalasin D-induced Golgi fragmentation, as well as the Golgi export of synaptophysin-containing vesicles. LIMK1 kinase dead mutant has the opposite effect. LIMK1 enhances the accumulation of Par3/Par6, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, and the neural cell adhesion molecule (NCAM) at growth cones, suggesting that it plays a crucial role in the delivery of these proteins to growth cones. These results suggest that a key role is played by LIMK1 in the Golgi dynamics and membrane trafficking in neurons [90]. Salvatore et al. also reported the implication of LIMK1 and cofilin in the trafficking of proteins out of the Golgi apparatus in Madin–Darby canine kidney cells (MDCK). They showed that LIMK1, but not LIMK2, is localised at the Golgi apparatus, where it induces a specialised population of actin filament apparatus that is required for the emergence of an apical cargo route to the plasma membrane (PM), with a high specificity. Indeed, LIMK1, but not LIMK2, regulates the exit from the trans-Golgi network (TGN) of the apical PM marker p75 neurotrophin receptor and NHR2, a related receptor, but is not involved in the exit of another apical PM marker glycosyl phosphatidylinositol (GPI), nor the basolateral PM marker neural cell adhesion molecule (NCAM). The overexpression of a kinase dead LIMK1 mutant, a constitutively activated cofilin, or the use of LIMK1 siRNA, selectively slowed down this exit from the TGN. These authors also showed that in p75 carrier vesicles, LIMK1 cooperates with dynamin 2, and cortactin and syndapin, two dynamin-interacting proteins for the fission processes of the vesicle from the TGN [91]. To our knowledge, the role of LIMK1 in membrane trafficking was only documented by these two papers.

6. Involvement of LIMKs in Different Pathologies

6.1. Cancer

Because they play a crucial role in actin cytoskeleton remodelling, cell shape, proliferation, and motility, there is growing evidence that LIM kinases are involved in tumour cell invasion, tumour growth, and metastasis. Indeed, LIMK1 and LIMK2 have been shown to be upregulated in breast cancer [58], gastric cancer [59], prostate cancer [92,93], and malignant melanoma cells [94], and they seem to be involved in multiple non-canonical signalling pathways that, when dysregulated, actively participate in tumorigenesis.

6.1.1. Breast Cancer

With 2.3 million diagnoses in 2020, breast cancer is the most common and deadliest form of cancer in women [95]. LIMK1 and LIMK2 have been reported to be overexpressed in breast cancer [58,96], and there is growing evidence of their implication in molecular pathways with interactors linked to breast cancer tumorigenesis (Figure 5).

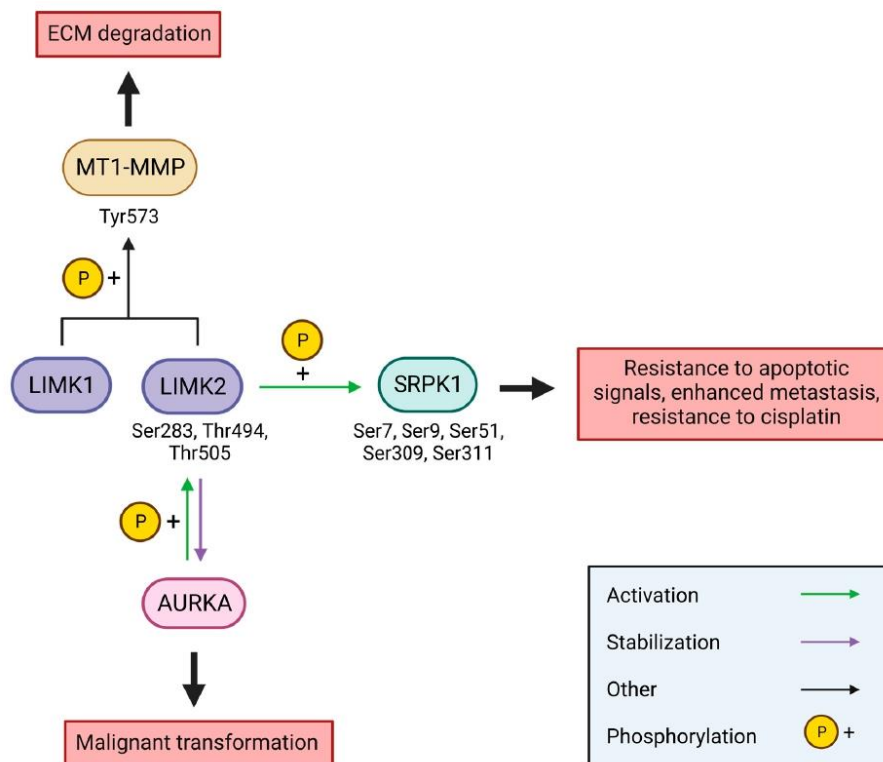


Figure 5. LIM kinases molecular implication in breast cancer. LIMK2 sites phosphorylated by AURKA are mentioned (Ser283, Thr494, and Thr505), as well as SRPK1 sites phosphorylated by LIMK2 (Ser7, Ser9, Ser51, Ser309, and Ser311), and MT1-MMP site phosphorylated by LIMK1 and LIMK2 (Tyr573).

Aurora kinase A (AURKA) is overexpressed in several types of cancer, including breast cancers, where it plays a role by aberrantly phosphorylating the proteins implicated in the cell cycle, ultimately leading to cell malignant transformation [97]. LIMK2 directly interacts with AURKA via its LIM domains in coIP experiments, which increases its levels by inhibiting its ubiquitin-dependent degradation and restraining its localisation to the cytoplasm. AURKA is also able to activate LIMK2 by the phosphorylation of its Ser283, Thr494, and Thr505, resulting in: (i) the increased kinase activity on cofilin, (ii) higher levels of LIMK2 via the prevention of its ubiquitin-dependent degradation, and (iii) the restraining of its localisation in the cytoplasm. Reciprocally, LIMK2 is required for AURKA-mediated cellular transformation in breast cancer, indicating that LIMK2 is a key oncogenic effector of AURKA in breast cancer malignancy [33].

Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) has also been described as a target of LIMK2, and this connection plays a major role in triple negative breast cancer metastasis. Through SILAC experiments that used LX7101, an inhibitor of LIMKs, Malvi et al. have shown a strong decrease in SRPK1 phosphorylation on several serines (Ser7, Ser9, Ser51, Ser309, and Ser311) [96]. SRPK1 is involved in the splicing of pre-messenger mRNA, a mechanism which is imbalanced in malignant tumour cells. When overexpressed, SRPK1 is responsible for resistance to apoptotic signals [98], resistance to cisplatin therapy [99], and enhanced metastasis [100]. LIMK2 is overexpressed in triple-negative breast cancer (TNBC) and pharmacological inhibition, with LX7101 or TH-257, leads to the inhibition of the metastatic

characteristics of TNBC cells (migration, invasion, actomyosin contractility, and extracellular matrix degradation). No direct interaction by coIP was detected between SRPK1 and LIMK2. However, an *in vitro* kinase assay pointed out the serine phosphorylation of SRPK1 on a recombinant protein, validated by immunoblotting. The inhibition of SRPK1 blocked the metastatic properties of TNBC cells, which led to the thought that LIMK2 promotes the metastatic progression of triple-negative breast cancer by activating SRPK1. The pharmacological inhibition of LIMKs by LX7101 inhibits metastatic progression in mice, but has no effect on primary tumour growth [96]. As LX7101 is a dual inhibitor of LIMKs and their upstream regulating kinase ROCK, we cannot rule out a role of ROCK in this phenomenon. However, another assay with the LIMK inhibitor Pyr1 on xenografted mice that were developing breast tumours and paclitaxel resistance showed a blockage of primary tumour growth, but not of their spread [101]. Pyr1 prevents cofilin phosphorylation by inhibiting LIMK1 and LIMK2 *in vitro* and in cellulo on HeLa cells. Pyr1 is a selective inhibitor of LIMK1: on a panel of 66 kinases, there were only three hits (MLK1, NEK11, and LIMK1), with the highest inhibition observed for LIMK1 (4% residual *in vitro* kinase activity). A thermal stability shift assay confirmed Pyr1 selectivity for LIMK1 [70].

LIMK1 and LIMK2 were also shown to interact with the membrane-anchored type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP, or MMP14) in triple-negative breast cancer. To be able to spread, cancer cells need to degrade the extracellular matrix (ECM). In breast carcinoma, the dissemination of metastasis involves MT1-MMP, which participates in the degradation of ECM and is overexpressed in several cancers. A direct interaction between LIMK1/LIMK2 and MT1-MMP has been shown by coIP via the “DVK” motif of MT1-MMP. MT1-MMP phosphorylation by LIMKs on Tyr573 modulates its interaction with cortactin, a F-actin-binding protein. Lagoutte et al. showed that LIMK1 regulates the cortactin association with MT1-MMP-positive endosomes and associates with the MT1-MMP in endosomes, while LIMK2 participates in the formation of invadopodia-associated cortactin pools, indicating that both are necessary for MT1-MMP-induced matrix degradation and the tumour cell invasion in breast tumour [49].

6.1.2. Prostate Cancer

Prostate cancer is the second most common cancer in men after lung cancer [102]. LIMK1 [92] and LIMK2 [93] are overexpressed in prostate cancer and prostate cell lines, and numerous LIMK partners that are dysregulated in prostate cancer have been discovered over the last years.

The group of Shah has been particularly active in demonstrating the role played by LIMK2 in prostate cancer over the last years. They pointed out several proteins that are directly phosphorylated by LIMK2, and then ubiquitinated and subsequently degraded by the proteasome. These different partners also regulate the LIMK2 stability by promoting its ubiquitination. Many feedback loops are described [93,103–105] (Figure 6).

Nikhil et al. depicted Twist-related protein 1 (TWIST1) as a new partner of LIMK2. TWIST1 is a transcription factor involved in embryonic development and organogenesis [93]. It is overexpressed in many cancers, where it drives tumour initiation, angiogenesis, dissemination, and drug resistance [106]. In adults, TWIST1 expression is limited to the quiescent stem cells located in mesenchymal tissues, but it is upregulated following androgen deprivation therapy (ADT) via TGF- β signalling, mediating the cancer prostate aggressiveness and development of castration-resistant prostate cancer (CRPC), a metastatic form of prostate cancer. LIMK2 and TWIST1 are interconnected in a synergic feedback loop. In an *in vitro* kinase assay with purified proteins, the authors show that LIMK2 phosphorylates TWIST1 on four different serines (Ser45, Ser78, Ser95, and Ser199), resulting in a decreased level of the ubiquitination of TWIST1 and, thereby, its stabilisation. This TWIST1 phosphorylation by LIMK2 is required for cell growth and migration, promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT), and is crucial for tumorigenesis *in vivo* in xenograft mice. TWIST1 phosphorylation and stabilisation via LIMK2 also increases LIMK2 levels by inhibiting its ubiquitination and thus, its degradation. LIMK2 silencing decreases the TWIST1

mRNA levels under hypoxic conditions, but not under normoxia, whereas it decreases the TWIST1 protein levels under both conditions. Furthermore, the sequential treatment of prostate cancer cell line C4-2 with docetaxel, a well-established treatment for CRPC, and then with an LIMK2-specific inhibitor [107], resulted in a significant cellular death [93]. This high synergy is very promising for the future treatment of hormone-independent CRPC.

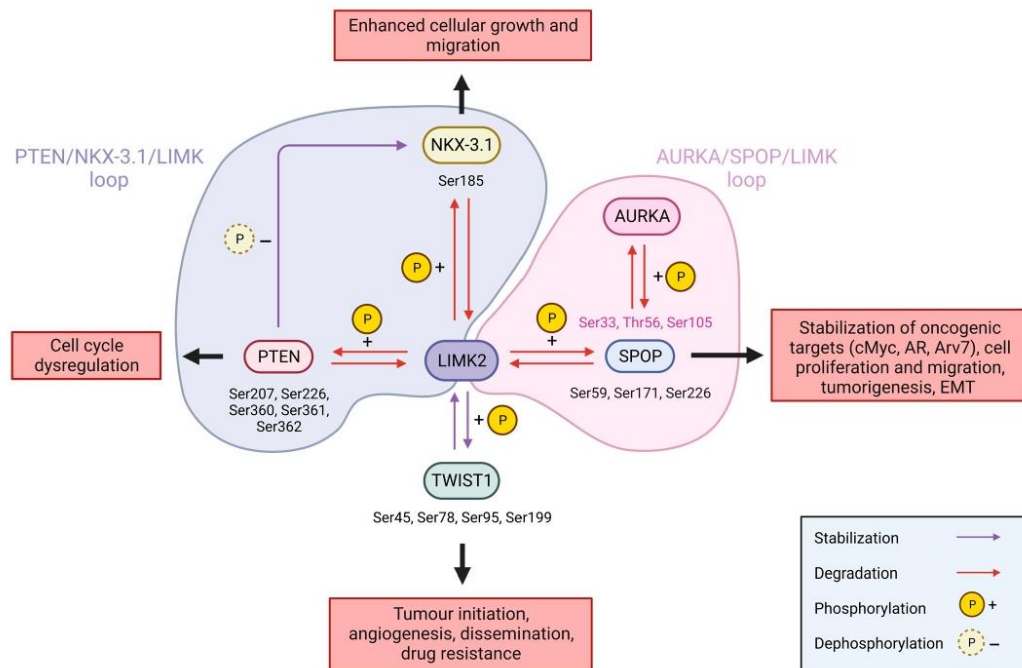


Figure 6. LIM2 molecular implication in prostate cancer. PTEN/NKX-3.1/LIMK and AURKA/SPOP/LIMK feedback loops are depicted with blue and pink areas, respectively. PTEN sites phosphorylated by LIMK2 (Ser207, Ser226, Ser360, Ser361, and Ser362), TWIST1 sites phosphorylated by LIMK2 (Ser45, Ser78, Ser95, and Ser199), as well as SPOP sites phosphorylated by LIMK2 (Ser59, Ser171, and Ser226), and NKX-3.1 site phosphorylated by LIMK2 (Ser185) are mentioned in black. SPOP sites phosphorylated by AURKA (Ser33, Thr56, and Ser105) are mentioned in pink.

SPOP, an E3 ubiquitin ligase adapter that is involved in numerous cellular mechanisms, is another partner of LIMK2. SPOP is the most mutated gene in CRPC, and a vast majority of these identified mutations alter its ability to ubiquitinate some of its oncogenic targets [108]. No direct interaction between LIMK2 and SPOP was detected by coIP with endogenous proteins. However, in an in vitro assay on purified proteins, SPOP is directly phosphorylated by LIMK2 on Ser59, Ser171, and Ser226, which causes its retention in the nucleus, and decreases its stability by increasing its ubiquitination. SPOP phosphorylation with LIMK2 decreases its ability to: (i) degrade its targets cMyc, androgen receptor (AR), and androgen receptor splice variant-7 (Arv7) by ubiquitination, (ii) inhibit cell proliferation and migration, (iii) prevent tumorigenesis in mice, and (iv) reduce EMT in vivo. Conversely, SPOP targets LIMK2 for ubiquitination and participates in its degradation via the proteasome [103]. Hence, LIMK2 and SPOP are part of a double negative feedback loop. SPOP also interacts with AURKA through coIP on endogenous proteins, which directly phosphorylates it on three sites (Ser33, Thr56, and Ser105), causing its ubiquitination and

degradation. SPOP also degrades AURKA via a feedback loop [104]. The positive feedback loop existing between AURKA and LIMK2 [33] could be an aggravating factor to prevent the SPOP tumorigenesis inhibition.

Upon hypoxia, in 22Rv1, PC-3, and LN95 prostate cancer cell lines, LIMK2 is upregulated and phosphorylates the phosphatase and TENSin homolog protein (PTEN) at five sites (Ser207, Ser226, Ser360, Ser361, and Ser362), causing its ubiquitination and degradation. No direct interaction via coIP was reported, but an in vitro kinase assay with purified proteins depicts a direct phosphorylation of PTEN by LIMK2. PTEN is a phosphatase involved in the regulation of the cell cycle. When dysregulated because of gene mutations or post-translational modifications, PTEN will drive the development of CRPC. PTEN is also known to be downregulated in hypoxic tumours, following castration via androgen deprivation therapy (ADT). LIMK2 also inhibits its lipid phosphatase activity upon phosphorylation. They are engaged in a negative regulatory loop, since PTEN promotes the degradation of LIMK2 by ubiquitination as well [109].

Homeobox protein NKX-3.1 is a prostate-specific transcription factor and tumour suppressor protein, which plays a role in cell differentiation, maintenance, and lineage plasticity. Its genetic loss is strongly associated with prostate cancer development. Encoded by an androgen-responsive gene, NKX-3.1 is downregulated following ADT and the subsequent hypoxia. In an in vitro assay using purified proteins, Soreshjani et al. showed that NKX-3.1 is phosphorylated by LIMK2 on its Ser185. This phosphorylation is required for NKX-3.1 ubiquitination and its subsequent degradation, leading to enhanced cellular growth and migration. Moreover, LIMK2 also regulates NKX-3.1 at the mRNA level. NKX-3.1, in return, promotes LIMK2 ubiquitination and degradation, linking both proteins in a negative feedback loop [105]. Bowen et al. also established a link between NKX-3.1 and PTEN, where PTEN dephosphorylates NKX-3.1 at Ser185, thus enhancing its stability [110]. PTEN, which is downregulated in prostate cancer, has been shown to be an LIMK2 substrate which phosphorylates it and participates in its degradation [109]. Thus, the relations existing between LIMK2, PTEN, and NKX-3.1 could be an aggravating factor in CRPC development.

The LIMK2 targets described above are tumour suppressor proteins, whose degradation upon ubiquitination is promoted by LIMK2 phosphorylation, and is a major step in tumorigenesis progression.

LIMK1, which is found to be upregulated in prostate cancer samples and cancer cell lines, also seems to play a role in prostate cancer pathogenesis [92]. Mardilovich et al. depicted a correlation between elevated LIMK1 expression and activity, high phospho-cofilin levels in prostate cancer patient samples, and poor survival in non-metastatic prostate cancer. LIMK2 expression in non-metastatic PC showed a similar trend, but further investigations are needed. However, LIMK inhibition with a selective LIMK inhibitor, LIMKi 3 (BMS-5), reduced cell motility, inhibited proliferation, and increased apoptosis in androgen-dependent PC cells more effectively than in androgen-independent PC cells. Indeed, LIMKi 3 (BMS-5) has an inhibitory effect on AR nuclear translocation and AR- α Tubulin interaction, leading to its retention in the cytoplasm and its subsequent degradation. Since LIMKs are well-described effectors of cytoskeleton remodelling as they are implicated in both actin filament and microtubule rearrangements, an involvement of LIMKs in AR regulation is probable [111]. Hepatocyte growth factor (HGF) has also been linked to the enhancement of prostate carcinoma cell proliferation and invasiveness [112,113]. Ahmed et al. showed that HGF, to which PC-3 prostate cancer cells respond in a chemotactic way, was able to activate PAK4. This activation leads to a specific HGF-driven PAK4/LIMK1 interaction, LIMK1 phosphorylation and activation, cofilin phosphorylation, and an increase in cell motility. Thus, the interaction between PAK4 and LIMK1 could be an essential factor in prostate cancer invasiveness [114].

6.1.3. Leukaemia

The term “leukaemia” regroups different kinds of malignant disorders of the blood and bone marrow. They are characterised by an abnormally high leucocyte count in blood and/or bone marrow and are subdivided in multiple subtypes [115]. The most common one is acute myeloid leukaemia (AML), an aggressive form of leukaemia for which there are very few therapies. LIMK1 and LIMK2 have been described as potential targets for treating AML.

In the human acute monocytic leukaemia cell line THP-1, an interaction between PKC ζ and LIMK1, but not LIMK2, was detected by coIP experiments upon CSF1 stimulation [116]. CSF-1 cytokine causes a hematopoietic stem cell differentiation into macrophages. PKC ζ , an atypical PKC, is required in chemokine-triggered cell adhesion and the actin assembly in polymorphonuclear cells. Furthermore, the KO of PKC ζ by siRNA blocked the CSF-1-induced LIMK1 and cofilin phosphorylation in THP-1 cell lines, resulting in impaired migration. All these data suggest that PKC ζ may phosphorylate LIMK1 upon CSF-1 stimulation. LIMK1 might trigger the chemoattraction of macrophages by tumour cells upon CSF-1 release and PKC ζ activation, leading to tumour invasion and metastasis [116] (Figure 7).

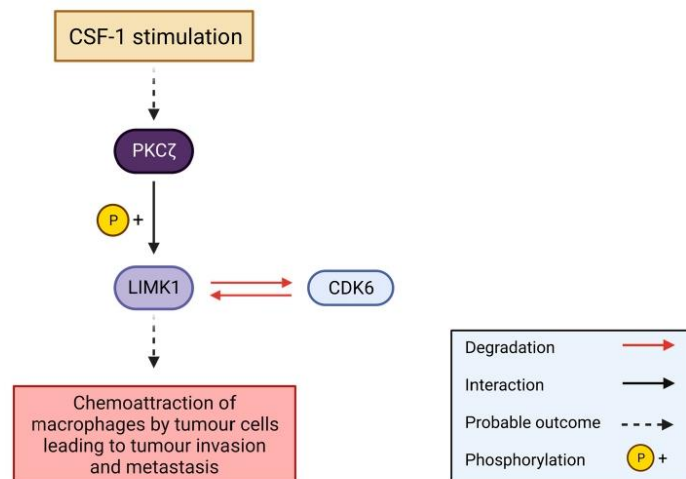


Figure 7. LIM kinases implication in the development of leukaemia.

Jensen et al. performed an RNA interference screening on three different AML cell lines (U937, U60 and OCI-AML3). They identified *LIMK1* as the only gene whose transcripts reduced the cell viability in all these cell lines when targeted by four independent shRNAs. Furthermore, by analysing The Cancer Genome Atlas (TCGA) AML databank, they pointed out a significant association between the high expression of LIMK1 and a shorter survival, and data from the Microarray Innovations in Leukaemia and TCGA AML allowed them to correlate the high LIMK1 mRNA level with the normal karyotype and *KMT2A*-rearrangement AML. The *KMT2A* gene encodes for the histone-lysine *N*-methyltransferase 2A, which works as a positive regulator of gene transcription. As these genetic subtypes are well characterised for recurrent driver alterations, authors have established a significant correlation between a high LIMK1 expression, *FLT3* and *NMP1* mutations, and *KMT2A*-rearrangements by further analysing TCGA AML databank. Suppression by shRNA or KO by the CRISPR-Cas9 gene-editing tool of LIMK1 or LIMK2 reduced the colony formation, decreased proliferation, and induced the morphological changes of different AML cell lines and patient-derived xenograft (PDX) samples, indicat-

ing a role for LIMKs in leukaemia tumorigenesis. The suppression of LIMK1 by shRNA was also associated with the upregulation of several tumour suppressor genes (*EGR1*, *BTG2*, and *BIN1*) and the downregulation of mitosis-associated genes (*HOXA9*-associated genes, which are transcription factors). Finally, the authors showed a negative correlation between the LIM kinases and cell division protein kinase 6 (CDK6). CDK6 depletion via shRNA or pharmacological kinase inhibition by Palbociclib leads to a higher level of LIMK1, as well as a higher activity of LIMK1, with an increase in cofilin phosphorylation, and the LIMK1 and LIMK2 suppression leads to an increased CDK6 expression. This negative correlation between LIMKs and CDK6 may be detrimental upon the pharmacological inhibition of both proteins. Authors have shown that the combined inhibition of both CDK6 and LIMKs by Palbociclib and LIMKi 3 (BMS-5), respectively, leads to synergic effects, with decreased proliferation and differentiated morphology [117].

The pharmacological inhibition of LIMKs represents a good therapeutic opportunity in AML. LIMKi 3 (BMS-5), an LIMK inhibitor [118], selectively suppressed the growth of T cell leukaemia (Jurkat and ATN-1), and induced centrosome fragmentation and apoptosis, whereas it had no impact on peripheral blood mononuclear cells [119]. The pharmacological inhibition of LIMKs does appear to be efficient for leukaemia treatment as Pyr1, a selective potent inhibitor of LIMKs, induced a complete survival gain of B6D2F1 mice bearing leukaemia L1210 cells, with no apparent toxicity [70]. Djamai et al. investigated the therapeutic potential of the LIMK1/2 inhibitor CEL_Amide (LIMKi) in FLT3-ITD-mutated (FLT3-ITD+) acute myeloid leukemia (AML). Treatment with LIMKi decreased the LIMK1 protein levels and phosphorylation of cofilin in FLT3-ITD+, MOLM-13, and MV-4-11 cell lines. In MOLM-13 cells, a synergistic effect was obtained when LIMKi was used concomitantly with the FLT3 inhibitors midostaurin, crenolanib, or gilteritinib, while combination experiments with LIMKi and the FLT3 inhibitor quizartinib, hypomethylating agent azacitidine, or ROCK inhibitor fasudil, were additive. Moreover, in NOD-SCID mice that were engrafted with MOLM13-LUC cells, the FLT3 inhibitor midostaurin, or LIMKi alone, delayed the MOLM13-LUC engraftment, and their combination significantly prolonged the survival of leukemic mice. Taken together, these data suggest that the small molecule inhibitor CEL_Amide LIMKi might constitute a novel treatment strategy for FLT3-ITD+ AML, when used in combination with FLT3 inhibitors [120]. The same group evaluated the efficiency of CEL_Amide LIMKi in Philadelphia chromosome-positive (BCR::ABL+) acute lymphoblastic leukemia (ALL), another subtype of leukaemia. In Ph+ (BCR::ABL+) B-ALL, ROCK is constitutively activated, leading to LIMK phosphorylation and thereby cofilin inactivation, and the subsequent abrogation of its apoptosis-promoting activity. In BCR::ABL+ TOM-1 and BV-173 cell lines, and in patient cells, the LIMKi treatment decreased the LIMK1 protein expression, whereas the LIMK2 protein expression was unaffected. Cofilin dephosphorylation was nevertheless observed. The conjoint treatments of CEL_Amide and the BCR::ABL tyrosine kinase inhibitors (TKIs) imatinib, dasatinib, nilotinib, and ponatinib were synergistic for both TOM-1 and BV-173 cell lines. Mice transplanted with CDKN2Ako/BCR::ABL1+ B-ALL cells displayed a prolonged survival when treated with a combination of LIMKi and TKIs, indicating that CEL_Amide might be a promising new therapy for BCR::ABL+ ALL [121].

6.1.4. Osteosarcoma

A comprehensive overview of the role of LIMKs in osteosarcoma is depicted in the review by Brion et al. [122] in this Special Issue, and we will focus here on the main molecular features.

Osteosarcoma (OS) is the most common solid bone malignancy in children and adolescents, characterised by the proliferation of malignant mesenchymal cells which produce osteoid and/or immature bone. Lung metastasis is a frequent evolution of the disease and participates in its poor prognosis [123]. Both LIMKs have been shown to play a role in OS malignancy.

Several studies have shown that LIMK1 is overexpressed in osteosarcoma through immunohistochemistry on patient tissues. A WB analysis and RTqPCR on different OS cell lines (MG63, U2OS, OS732, and SaOS-2) show the overexpression of LIMK proteins and mRNA, respectively, compared to normal osteoblasts (hFOB 1.19) [124–126]. This is correlated with higher migration and invasion propensities, and limited apoptosis. Li et al. have shown that the signalling cascade PAK4/LIMK1/cofilin is activated in OS and associated with metastasis and poor survival [125]. PAK4 knockdown or silencing in MG63 diminishes the cell viability, migration, and invasion, and limits the growth of subcutaneous transplanted tumour in nude mice [125].

Different peptides or proteins (Insulin, EGF, and VEGF) have been shown to promote OS proliferation, migration, and invasion. In trying to understand the molecular mechanism involved in these phenomena, the implication of LIMKs has been pointed out. Insulin promotes the proliferation of MG63 osteosarcoma cells in a time- and dose-dependent manner, and also induces LIMK1 and cofilin phosphorylation. Moreover, upon LIMK1 KO using shRNA, insulin-induced proliferation is significantly inhibited, as well as when the cells were treated with the PI3K inhibitor LY294002. In these conditions, LIMK1 phosphorylation is reduced, indicating a possible role for LIMK1 in regulating the osteosarcoma cell proliferation via the insulin/PI3K/LIMK1 signalling pathway [124]. The epidermal growth factor (EGF) also promotes MG63 osteosarcoma cell migration and invasion, as well as stress fibre formation via RhoA activation. All the proteins of the signal transduction pathway RhoA/ROCK1/LIMK2/cofilin are activated upon the EGF treatment of MG63 cells. Moreover, the selective inhibition of ROCK1, LIMK2, or cofilin in the MG63 cells by shRNA prevents actin stress fibre formation and cell migration. These data delineate a role for RhoA/ROCK1/LIMK2/cofilin signalling in actin microfilament formation, and the migration and invasion increase in the MG63 cells upon EGF activation [127]. OS cell metastasis in lungs is an early stage of the pathology, and VEGFR2 and PD-L2 are overexpressed in lung metastasis. VEGFR2 inhibition by shRNA or by apatinib, a small molecular tyrosine kinase inhibitor, reduced the osteosarcoma cell migration, invasion, and metastatic potential, and downregulated the STAT3 and RhoA/ROCK/LIMK2 pathways. STAT3 silencing decreased the LIMK and cofilin phosphorylation. Moreover, VEGFR2 inhibition by apatinib reduced the PD-L2 expression in osteosarcoma cells and attenuated the osteosarcoma lung metastasis capacity in vivo [128–130]. Accordingly, Ren et al. showed that PD-L2 knockdown attenuated the migration and invasion of OS cells, and decreased the LIMK and cofilin phosphorylation, as well as RhoA activation. It also suppressed EMT and inhibited autophagy by decreasing the beclin-1 expression. Beclin-1 knockdown also led to the inactivation of RhoA, as well as an LIMK2 and cofilin phosphorylation decrease, while PD-L2 knockdown inhibited the OS cell metastasis in lungs but had no effect on the primary tumour size [128]. All these data show that VEGFR2 and PD-L2 promote OS lung metastasis via RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathways. Bone morphogenetic protein type II receptor (BMPR2) was found upregulated in a majority of the osteosarcoma tissues, and its overexpression has been correlated to a poor overall survival. The depletion of BMPR2 in 143B cells diminished the LIMK and cofilin phosphorylation, as well as the cell migration and invasion in vitro, and increased the EMT. In vivo, BMPR2 depletion has no impact on the primary tumour size, however, it inhibits lung metastasis. BMPR2 was shown to interact with LIMK2 by co-immunoprecipitation experiments on U2OS cells. BMPR2 depletion decreased the LIMK and cofilin phosphorylation, whereas BMPR2 overexpression increased the LIMK and cofilin phosphorylation and activated RhoA by promoting its GTP-bound form [131]. Another study has shown an interaction between LIMK1 and BMPR2 by a yeast two-hybrid screening and by the co-immunoprecipitation of the proteins overexpressed in COS7 (via their LIM and C-terminal domain, respectively), or of the endogenous proteins in fibroblasts. An in vitro phosphorylation assay suggested that BMPR2 inhibited cofilin phosphorylation via LIMK1. Furthermore, it was shown that BMPR2 and PAK4 compete to interact with LIMK1 [132]. The discrepancy between these two studies may be explained by different points: (i) LIMK1 and LIMK2 may behave

differently towards BMPR2, and (ii) in OS cells, BMPR2 may interact with another partner, modulating its activity towards LIMKs.

Drug resistance is a major problem in osteosarcoma treatment, leading to poor prognosis. Vincristine (VCR) is widely used and is an effective chemotherapeutic agent to treat osteosarcoma. Different studies have explored the molecular mechanism of drug resistance by developing different MG63 cell lines that are resistant to VCR, MG63/VCR [61,126,133]. MG63/VCR appeared to be resistant to many other anticancer drugs (multidrug resistance, MDR), exhibiting a higher migration capacity compared to that of MG63 cells. In MG63/VCR, LIMK1 is overexpressed at both the mRNA and protein levels, with a subsequent elevated cofilin phosphorylation. The knockdown of LIMK1 inhibited the migration of MG63/VCR cells, suggesting that LIMK1 dysregulation contributes to the invasion and metastasis potential of drug-resistant osteosarcoma [61]. MDR-associated genes (MDR1, MRP1, and BCL2) are upregulated in MG63/VCR. MDR1 expression was positively correlated with LIMK1 expression, as was LIMK1 silencing with an enhanced apoptosis in the MG63 cells treated with VCR. These data suggest that LIMK1 is implicated in the MDR of osteosarcoma, probably by inducing MDR1 expression and/or activation and by limiting apoptosis [126,133].

As Rac1/PAK1/LIMK1/cofilin and RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathways have been shown to be activated in OS pathology, these proteins, especially LIMKs, appear as promising therapeutic targets to treat this disease. Several inhibitors of these pathways have shown promising results. Sea cucumber polysaccharide fucoidan (Cf-Fuc) significantly diminished the migration and adhesion capacity of U2OS cells and the remodelling of the actin cytoskeleton. Cf-Fuc inhibited the phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and paxillin, as well as LIMK1 and cofilin phosphorylation, and Rac1 activation [134]. 6-hydroxythiobinupharidine that was isolated from *Nuphar pumilum* also suppressed the migration of murine LM8 osteosarcoma cells by decreasing the expression of LIMK1 and cofilin phosphorylation [135]. Taken together, these results indicate a high potential for therapy-targeting LIM kinases.

6.1.5. Glioblastoma

Glioblastomas (GBM) are the most common and aggressive primary brain tumour in adults, exhibiting a very high infiltration and a very poor prognosis, since their survival time is less than two years upon diagnosis. GBM derive from multiple cell types with neural stem-cell-like properties and require multi-modal therapies, including chemotherapy, radiotherapy, and surgical intervention, which are commonly used [136]. However, despite this tough treatment, most GBM recur; hence, it is necessary to understand the molecular mechanisms of the pathology and to develop new and specific therapies for GBM.

Several studies have shown that LIMK1 and LIMK2 are overexpressed and overactivated in patient tissue and different GBM cell lines. Park et al. performed a microarray analysis of the normal brain versus mesenchymal GBM and observed an increase in LIMK and cofilin expression [137]. An analysis of the gene expression data from TCGA and REMBRANDT, and a clinically annotated dataset from several groups confirmed these data: the clinical features of GBM are correlated with changes in LIMK expression. LIMKs are upregulated at the mRNA and protein levels in GBM, and patients with gliomas that exhibit downregulated LIMKs have a better overall survival [60,137,138]. The upregulation of LIMKs is also observed in different GBM cell lines (U87, T98G and U118) [137,138].

As they have been shown to be upregulated in GBM cell lines and patients, and as they play important roles in cell polarisation, migration, and invasion, LIM kinases were thought to be suitable therapeutic targets for the treatment of GBM by inhibition. The knockdown of both the LIM kinases with shRNA significantly reduced the invasion of the GBM cell lines and of the human GBM tumour-initiating cells (TICs), which is a more clinically proximal culture model, as it forms infiltrative tumours when xenografted in mice. Moreover, the tumours derived from LIMK1/LIMK2-knockdown TICs were significantly smaller, as they grew slower compared to the tumours derived from the control TICs. They

also spread at lower rates (with a reduced invasion propensity), resulting in an increase in survival [60]. However, surprisingly, Erktulu et al.'s RNA analysis of the paraffinized tumour tissue from 98 patients that were diagnosed with GBM pointed out that LIMK1 mRNA upregulation is correlated with an increased survival (more than six months) upon surgery [139].

Several proteins have been shown to regulate the LIMK and cofilin in GBM: PKC ζ and intersectin-1 [116,140]. PKC ζ is an atypical PKC. An interaction between endogenous PKC ζ and LIMK1, but not LIMK2, was shown in the LN229 glioblastoma cell line upon EGF stimulation. The knockdown of PKC ζ by siRNA in cell lines, as well as in mouse xenografted tumours, resulted in the specific and important impairment of glioblastoma cell migration and invasion. PKC ζ silencing impaired the phosphorylation of LIMK and cofilin, indicating that PKC ζ regulates both the cytoskeleton rearrangement and cell adhesion, thereby contributing to cell migration via the LIMK-cofilin pathway [116]. Intersectin-1 coordinates the endocytic trafficking with the actin assembly machinery. Like PKC ζ , the knockdown of intersectin-1 by siRNA in GBM cell lines leads to a decrease in PAK, LIMK, and cofilin phosphorylation, as well as in migration and invasion. Some partners of LIMKs, PTEN, and Nf1 could also trigger the implication of LIMKs in GBM [140]. A loss of PTEN function is associated with a poor survival in anaplastic astrocytoma and glioblastoma. An overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in heterozygous PTEN KO mice leads to the development of invasive glioma, which is very similar to human glioblastoma, indicating that PTEN plays a role in glioma progression [141]. Since it has been shown in prostate cancer cell lines that LIMK2 and PTEN are engaged in a negative regulatory loop, where PTEN promotes the degradation of LIMK2 by ubiquitination and LIMK2 inhibits PTEN function and promotes its degradation, an implication of LIMK2 in PTEN-loss-driven GBM aggressiveness might be considered [109]. Neurofibromin 1 (Nf1) is one of the most mutated genes in GBM. An interaction between Nf1 and LIMK2 that results in the inhibition of LIMK2 with Nf1 has been shown [142]. Similarly, Nf1 was shown to inhibit the PAK4/LIMK1/cofilin pathway [143]. The Nf1 mutations encountered in GBM may result in a loss of its inhibitory activity on LIMKs, also contributing to the overactivation of LIMKs observed in GBM.

Several chemical inhibitors of LIMKs were also used in GBM. Park et al. used LIMKi 3 (BMS-5) on two GBM cell lines and they showed significant decreases in the viability of the GBM cells treated, with no cytotoxic effects on the normal astrocytes [137]. BMS-5 increased the adhesion of GBM cells, and decreased their migration and invasion, as well as their cofilin phosphorylation [137]. Schulze et al. also used LIMKi 3 (BMS5) and observed different responses depending on the cell lines (chemo-sensitive NCH644 vs. chemo-resistant NCH421k) [144]. Cucurbitacin I, which inhibits cofilin phosphorylation through an unknown mechanism, and alantolactone, which inhibits cofilin in a dose-dependent manner, were also tested on different GBM cell lines, and similar effects were observed: a decrease in migration and invasion, and an increase in apoptosis and adhesion [137,145]. These results are in favour of the regulation of the GBM invasive motility and tumour progression of LIM kinases.

6.2. Neuronal Diseases

Several studies on knockout animal models have made clear the implication of LIM kinases, and more particularly LIMK1, in neurodevelopment and synaptic plasticity. Integrating multiple pathways to regulate finely dendritic spines, synaptic plasticity [84], learning, memory [146], and neuron migration [147] through actin dynamics, LIM kinase dysregulations have been reported in many brain diseases.

6.2.1. Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common form of dementia, accounting for 60 to 80 percent of cases [148]. It is characterised by a progressive loss of cognitive functions, such as memory and visuo-spatial impairments [148,149],

accompanied by neuropsychiatric symptoms including depression, apathy, and anxiety [148,150,151]. AD is typically hallmarked by early synaptic loss, an accumulation of the extracellular deposits of beta-amyloid peptides ($A\beta_{42}$) in senile plaques, and the development of neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau [152–154]. $A\beta_{42}$ results from the proteolysis of amyloid precursor proteins (APP) with secretases and their abnormal production and aggregation is directly linked to neurotoxicity, driving the synaptic damages and dendritic loss characteristic of AD [155,156]. The formation of aberrant focal adhesion structures, cofilin–actin rods [157], Hirano bodies composed of ADF/cofilin and actin [158,159], and abnormal actin stabilisation suggest that actin cytoskeleton remodelling has a role in pathological neuroplasticity [160,161].

Synaptic strength and activity are deeply linked to spine morphology [87]. Several studies have shown an increase in phospho-LIMKs and phospho-cofilin in the AD brain area of patients or AD animal models by using western blot or immunofluorescence [155], more particularly in the post-synaptic compartment of excitatory synapses [161], as well as an increase in the ROCK protein level [162,163]. As the antibodies against phospho-LIMKs recognise both the phospho-Thr508 of LIMK1 and the phospho-Thr505 of LIMK2, it is not possible to discriminate the role of the activation of each protein. Both are probably concerned. These studies also pointed out an aberrant remodelling of the actin filaments (with an increased stabilisation) within spines, leading to neuritic dystrophy, with a reduction in the neuritic network and an impairment of the synaptic strength and plasticity of rat hippocampal neuron structures [155]. On the other hand, the expression of LIMK1 in hippocampal excitatory neurons increases cofilin phosphorylation, rescues the impairments of long-term potentiation, and improves the social memory of 3-month-old APP/PS1 transgenic mouse models [164].

Fibrillar $A\beta$ ($fA\beta$) treatment also activates Cdc42/Rac1/PAK1 signalling pathway, linking $fA\beta$ to actin dynamics via a different pathway to the Rho/ROCK pathway. Mendoza-Naranjo et al. established a time course activation of Cdc42/Rac1/PAK1 upon $A\beta$ treatment [156]. LIMK1 was activated (phosphorylated) concomitantly with PAK1. An activation of Cdk5 was also depicted, but later in the process, leading to hyperphosphorylation and the inactivation of PAK1. Surprisingly, no change in the cofilin phosphorylation level was observed at any time. The authors suggest an implication of the slingshot phosphatase SSH1 in this process and point out a fine balance between the kinase and phosphatase activation regulating cofilin phosphorylation, and subsequently actin remodelling upon $A\beta$ treatment [156].

Moreover, the treatment of rat hippocampal neurons with fibrillar $A\beta$ ($fA\beta$) increased the level of inactivated cofilin (Ser-3 phosphorylated) and activated LIMK1 (Thr-508 phosphorylated) with abnormal actin remodelling, neuritic dystrophy, and cell death. The inhibition of cofilin phosphorylation with S3 peptide, a specific competitor of Ser3 cofilin phosphorylation, diminished the effect of $fA\beta$ on actin filament remodelling and neuronal degeneration, indicating that LIMK1 plays a role in $fA\beta$ -induced neurotoxicity [155,161,165].

The pharmacological inhibition of ROCK by fasudil counterbalances $A\beta$ -induced features, especially synaptic loss [161]. Henderson et al. showed that ROCK2 is responsible for spine loss via LIMK1 activation, while ROCK1 proceeds via the myosin actin pathway [163]. Fasudil was also used on an AD rat model induced by streptozotocin treatment. Fasudil reverses learning and memory deficits, synaptic structure degeneration, and phospho-LIMK2 and phospho-cofilin increases [146]. The pharmacological inhibition of LIMK1 by SR7826 [166] on a hAPP mouse model of AD protects against $A\beta$ -induced neuronal hyperexcitability, $A\beta$ -induced spine degeneration, and rescued hippocampal thin spine loss. Synaptosome fractions of hippocampal tissue homogenates from a hAPP mouse treated with SR7826 showed reduced levels of phospho-cofilin. Interestingly, the ROCK knockdown by the siRNA in neurons or the ROCK heterozygous knockout mice suppressed the endogenous production of $A\beta$ by enhancing APP lysosomal degradation [162,163].

The nuclear receptor Nurr1 was shown to be associated with AD [167]. Indeed, upon the Nurr1 knockdown by shRNA in 5xFAD, an AD mouse model, the features of AD

pathology become worse, whereas the overexpression of Nurr1 (via lentiviral vector) or its pharmacological activation (amodiaquine agonist) reduce these features. LIMK1 has been shown to interact with Nurr1 by co-immunoprecipitation experiments, resulting in the inhibition of the Nurr1 transcriptional activity [41]. Further investigations on the LIMK1/Nurr1 relationship within an AD context could bring new insights into this field.

6.2.2. Parkinson's Disease

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease, and the most common movement disorder [81,168]. It is characterised by bradykinesia (slowed movements), resting tremor, rigidity, and postural instability [169]. These impairments are mainly due to the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) pars compacta, which can be imputed to the development of abnormal protein aggregates called "Lewy bodies" (LBs) and degenerated neurites ("Lewy neurites", or LNs) [170]. LBs are mainly composed of misfolded alpha-synuclein (α -synuclein), an abundant protein of the central nervous system, which is highly enriched in pre-synaptic nerve terminals [171,172].

As actin plays a crucial role in synaptic function, a link between actin and alpha-synuclein was investigated [173]. A direct interaction between cofilin and alpha-synuclein was detected through the co-immunoprecipitation of rat brain homogenates [174].

In a cell-free actin polymerisation *in vitro* assay, alpha-synuclein was shown to decrease actin polymerisation and to increase actin depolymerisation by sequestering actin monomers. Furthermore, Yan et al. showed that a cofilin/alpha-synuclein interaction promotes its aggregation [175]. These mixed fibrils that associate alpha-synuclein and cofilin are more compact and more potent in seeding alpha-synuclein aggregation, as their uptake is increased and more deleterious effects are observed on neuron morphology (especially neurites).

Alpha-synuclein is also released from neurons, and this extracellular alpha-synuclein was shown to activate the Rac/PAK2/LIMK/cofilin pathway via its interaction with GRP78, a chaperone heat shock protein [176]. Indeed, when hippocampal neurons are incubated with recombinant alpha-synuclein, an increase in phospho-PAK2 and phospho-cofilin was observed, along with an accumulation of lamellipodia-like actin protrusions along the neurites and at their tips. These effects were lost when the GRP78 was downregulated.

The Parkin gene is mutated in autosomal recessive juvenile Parkinsonism (ARJP) and early-onset Parkinsonism. The Parkin protein acts as an E3 ubiquitin ligase. Lim et al. [177] have shown that Parkin interacts with LIMK1 in HEK293 transfected cells, with the C-terminal part of Parkin and the N-terminal part of LIMK1 (LIM-LIM-PDZ) being involved in this interaction. Even though they focus on LIMK1, they showed a similar interaction between LIMK2 and Parkin. The authors could not detect an endogenous interaction on the mouse brain lysates. Parkin ubiquitinates LIMK1 and reduces the LIMK1-induced cofilin phosphorylation in dopaminergic neuronal BE(2)-M17, but not in HEK293 cells. Parkin also reduces the LIMK1-induced actin stress fibres in COS7 cells. Although LIMK1 does not phosphorylate Parkin, it lowers its ubiquitin ligase activity on itself and on p38-MAPK, one of its substrates. Therefore, Parkin and LIMK1 regulate each other.

Nurr1 is highly expressed in dopaminergic neurons, where it plays a role in cell differentiation and survival. Defects in Nurr1 expression have been associated with PD in animal models and in the brain samples from PD patients [178–180]. As mentioned earlier, LIMK1 interacts with Nurr1 and inhibits its activity upon phosphorylation [41]. Thus, the inhibition of the LIMK1-driven repression of Nurr1 activity could represent an opportunity for PD therapy.

6.2.3. Autism Spectrum Disorders

Autism spectrum disorders (ASD) is a term used to designate a multitude of early-appearing behaviour impairments regarding social communication. These disorders are also characterised by repetitive and unusual sensory–motor behaviours, even though

individuals with ASD display very different features to one to another [181]. Fragile X syndrome (FXS) is the most common inherited form of intellectual disability and autism spectrum disorder. Patients with FXS display severe behavioural dysfunctions, a hypersensitivity to sensory stimuli, anxiety, poor language development, and epileptic seizures. FXS is caused by the silencing of the FMR1 gene, which encodes the fragile X messenger ribonucleoprotein 1 protein (FMRP). FMRP has a central role in gene expression, through the regulation of the translation of mRNAs, which are suspected to be involved in the development and maintenance of neuronal synaptic connections [182,183]. Dysregulation of the synaptic actin cytoskeleton, dendritic spines morphology, and synaptic plasticity is particularly described in FXS subjects [184–186].

Mutations in the RAC1 gene were reported in ASD patients and several studies have shown that the disruption of Rac1 signalling in animal models leads to ASD-like behaviours [187]. Moreover, Rac1 levels and activity were shown to be significantly higher in FXS patients [188]. Pyronneau et al. showed that the Rac1/Pak1/LIMK/Cofilin pathway is implicated in the aberrant neuronal structures of patients with FXS [189]. Indeed, increased Rac1/PAK1/LIMK/Cofilin signalling in the somatosensory cortex of FMR1 KO mice has been linked to aberrant spine morphology and density. Notably, PAK1 inhibition rescued cofilin regulation, glutamatergic signalling, and sensory processing [189–191], which led to thinking that a deficiency in the PAK signalling pathway might play a role in human FXS pathogenesis. Moreover, PAK2^{+/-} mice display decreased synapse densities, defective long-term potentiation, and autism-related behaviours, and PAK2 nonsense mutations and deletions that impaired the PAK2 function have been found in large cohorts of patients with ASD [86].

BMPR2 mRNA is a target of FMRP [192]. BMPR2 is known to bind and activate LIMK1 in a pathway that stimulates actin reorganisation to promote neurite outgrowth and synapse formation [193]. The depletion of FMRP increased the BMPR2 abundance, which was observed in *Drosophila* and mouse models of FXS. The morphological defects associated with BMPR2-LIMK1 signalling [192,194] were rescued by BMPR2 heterozygosity or LIMK1 inhibition. A BMPR2 increase was also found in the prefrontal cortex of FXS patients [192], suggesting that LIMK1 could play a preponderant role in the actin-driven anomalies within the neuronal development of FXS patients.

Conversely, Yao et al. showed a downregulation of LIMK1 in the plasma samples of ASD patients [195], which happened to be contrary to the observations made regarding the BMPR2 increase in FXS. This difference could be the result of a different cellular context, since LIMK1 is mostly expressed in the central nervous system. The deregulation of LIMK1 expression might then be tissue-specific.

6.2.4. Schizophrenia

Schizophrenia (SZ) is a common, severe psychiatric disorder characterised by core features such as delusions and hallucinations, and by behavioural impairments including social withdrawal and depressive moods. SZ is a multifactorial disease caused by genetic and/or environmental factors [196]. A disturbance in glutamatergic functions and the deregulation of the actin cytoskeleton, especially regarding neuronal and synaptic dysfunctions, has been well characterised within SZ [197,198].

In the dorso lateral prefrontal cortex (DLPFC) of patients with SZ, the CDC42 gene is notably underexpressed [199–201]. Monkey models that were chronically exposed to antipsychotic medications showed no alteration in their CDC42 expression levels [199]. An analysis of CDC42-related gene expression displayed increased mRNA levels of LIMK1 and LIMK2 in the DLPFC of subjects with schizophrenia, implying that the CDC42/PAK/LIMK pathway has a role in the spine deficits in the DLPFC of SZ subjects [201]. Accordingly, another study showed an overexpression of LIMK2 in the nucleus accumbens, prefrontal cortex, and hippocampus of a neonatal ventral-hippocampal lesion rat model of SZ [202,203].

The neuronal inhibition of the 14-3-3 protein in KO mice leads to behavioural defects that correspond to the core symptoms of SZ, which could be imputed to an alteration of

the actin dynamics. Indeed, following this inhibition, the mice showed a reduction in dendritic complexity and spine density, as well as downregulated levels of phosphorylated cofilin [204]. Indeed, Gohla and Bokoch showed that the isoform 14-3-3 ζ was able to bind phosphorylated cofilin at Ser3 and protect it from phosphatase-mediated dephosphorylation [29]. 14-3-3 ζ was also shown to interact directly with LIMK1, which could prevent its kinase activity on cofilin [28] (Figure 8).

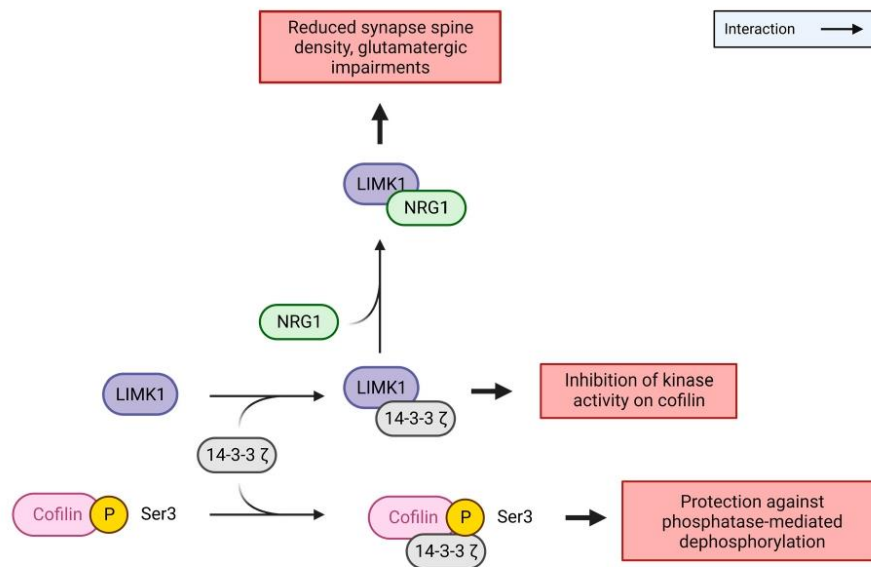


Figure 8. LIMK1 molecular implication in schizophrenia.

LIMK1 seems to play another role in SZ [205] notably through its interaction with neuroregulin 1 (NRG1), a protein involved in synaptic plasticity and in the expression/activation of neurotransmitter receptors, including glutamate receptors, which exerts its synaptic activity through LIMK1/cofilin-mediated actin reorganisation [206]. NRG1 mutations have been linked to SZ [207,208]. NRG1 transgenic mice, in which NRG1 is upregulated in the neurons of their forebrains, exhibited increased LIMK1 activity, reduced spine density, and glutamatergic impairment. The pharmacological inhibition of LIMK1 diminished these effects on spine density and ameliorated the glutamatergic impairments [208,209] (Figure 8).

Gory-Fauré et al. showed the dysregulation of the LIMK1 expression in MAP6 KO mice, a mouse model of SZ which display social withdrawal and anxiety-like features [210]. Treatment with the LIM kinase inhibitor Pyr1 rescued these behavioural impairments [210], making LIMK1 a potential target for the treatment of schizophrenia.

6.2.5. Williams–Beuren Syndrome

Williams–Beuren syndrome (WBS) is a rare genetic disorder that is characterised by distinctive craniofacial features, congenital heart disease, and cognitive and behavioural dysfunctions that include intellectual disability and hypersociability. WBS is caused by a heterozygous deletion of approximately 1.5 Mb at the chromosome 7q11.23, which leads to the loss of one copy of 25–27 genes, including LIMK1. The loss of LIMK1 is believed to be responsible for some of the neurological aspects of WBS, notably the impaired visual–spatial cognition and long-term memory dysfunctions [211]. Indeed, Gregory et al. showed that the hemideletion in Williams syndrome and the LIMK1 sequence variation in the general

population alter the functional connectivity of the intraparietal sulcus, a visual processing region, in similar ways [212]. Moreover, LIMK1 KO mice displayed impairments in fear processing, long-term memory, and spatial learning [84,213], which are features that could be associated with WBS. Further studies would be necessary to determine the molecular pathways that lead to these cognitive impairments induced by the LIMK1 deletion in WBS.

6.2.6. Amyotrophic Lateral Sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterised by progressive loss of motor neurons in the brain and spinal cord, leading to the paralysis of most of the body muscles. Death usually occurs upon respiratory paralysis, within 3 to 5 years after diagnosis [214]. ALS etiology is complex, with genetic and environmental components, but some genes, such as SOD1 and C9ORF72, have been markedly associated with ALS when dysregulated [214,215]. There is actually no efficient treatment for this disease [214], but a possible involvement of the dysregulation of the cytoskeleton in ALS pathogenesis opens up the way to new therapies [216].

First of all, C9ORF72 has been shown to interact with cofilin. And, C9ORF72-depleted cells and post-mortem brain samples from ALS patients exhibit enhanced cofilin phosphorylation. This increase results from the activation of the Rac1/PAK/LIMK/Cofilin pathway, since C9ORF72 modulates the activity of Rac1. In C9ORF72-depleted motor neurons, axonal actin dynamics are impaired, indicating that the Rac1/PAK/LIMK/Cofilin pathway has a role in C9ORF72-driven ALS [215] and that there is a therapeutic potential for LIMK inhibitors.

BMP-TGF- β signalling has also been associated with neuronal function, playing a role in synaptogenesis, axonal and dendritic growth, synaptic transmission, and neuronal survival. Disruptions in BMP/TGF- β signalling have been reported in a variety of neurological diseases, notably in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [217]. BMPR2, a BMP receptor, is known to bind and activate LIMK1 in a pathway that stimulates actin reorganisation, in order to promote neurite outgrowth and synapse formation [193]. The upregulation of BMP-TGF- β signalling could thus lead to an impairment of actin dynamics, which could result in defective axon and dendrite functioning.

Cdk5 is dysregulated in various neurological disorders, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [218]. When it is upregulated in AD and ALS, Cdk5 causes tau and neurofilament protein hyperphosphorylation, leading to neuronal cell death [219]. The Cdk5 inhibition of PAK1 has been shown to decrease the LIMK1 activity and to increase the active cofilin pool, leading to abnormal actin remodelling. Indeed, there is some evidence regarding the involvement of actin regulation as a causative and dysregulated process in ALS [216,218].

Myosin-binding protein H (MyBP-H) is a component of the thick filaments of the skeletal muscle that has strong affinity for myosin. It has been shown to be upregulated in ALS. A high MyBP-H expression level was also associated with the abnormal expression of Rho kinase 2 (ROCK2), LIM domain kinase 1 (LIMK1), and Cofilin2, indicating that the ROCK2/LIMK1/Cofilin2 pathway might play a role in ALS pathogenesis in muscles [220].

6.3. Neurofibromatosis

Neurofibromatosis are genetic orphan diseases without any connection to each other, except for the development of tumours in the nervous system. To date, three neurofibromatosis have been described: neurofibromatosis type 1 (NF1, or von Recklinghausen disease), neurofibromatosis type 2 (NF2), and schwannomatosis (NF3). An LIMK implication has been reported in NF1 and NF2 and will be discussed here.

6.3.1. Neurofibromatosis Type 1

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal-dominant disease and the most frequently diagnosed cancer predisposition disorder that involves the nervous system [221,222].

It is caused by inherited or de novo mutations in the gene encoding neurofibromin 1 (Nf1) [223], a GTPase-activating protein, which is highly expressed in the neuronal cells and acts a tumour suppressor by negatively regulating Ras pathways [224,225]. Neurofibromatosis type 1 is hallmarkd by the development of tumours in the central or peripheral nervous system, with high risk of malignancy. It is also characterised by cognitive dysfunctions, including learning impairments, attention deficits, and dysfunctional social behaviours [222,225].

The GAP-related domain (GRD) of Nf1 is the effector of the downregulation of Ras pathways, which are involved in cell growth. The pre-GAP domain was reported to play a role in cytoskeleton remodelling. Indeed, the N-terminal extremity of Nf1 affects cell adhesion and migration by negatively regulating the Rac1/Pak1/LIMK1/cofilin pathway [143]. Nf1 also plays a role in the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin pathway, acting as a negative regulator of this pathway. Its deletion has indeed been shown to activate the signalling cascade, affecting the actin cytoskeleton [226]. The SecPH domain of Nf1 interacts with LIMK2, but not LIMK1, inhibiting its phosphorylation and activation via ROCK [142]. In Nf1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs), an increase in phospho-LIMK and phospho-cofilin was shown [143] (Figure 9). Nf1 seems to play a role in the fine regulation of the actin cytoskeleton by regulating, in parallel, two signalling pathways that lead to ADF/cofilin phosphorylation. These pathways, when dysregulated, are known to be involved in various neuronal and synaptic pathological mechanisms, as well as in the progression of cancers. Taken together, these results could explain the pathological features associated with the disease, and LIMKs, as downstream effectors of these pathways, could be interesting therapeutic targets for NF1.

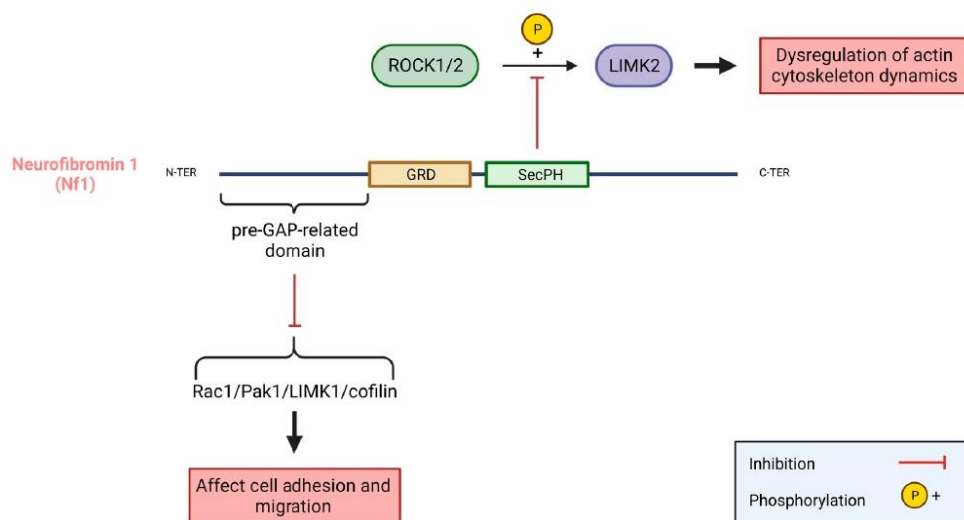


Figure 9. Interplay between Nf1 and LIM kinases, a key role in the development of neurofibromatosis type 1.

6.3.2. Neurofibromatosis Type 2

Neurofibromatosis type 2 is an autosomal-dominant neoplasia disorder caused by mutations in the neurofibromatosis 2 (NF2) gene, encoding a tumour suppressor protein called Merlin. It is characterised by nervous system tumours, notably multiple schwannomas, especially in the vestibulocochlear nerve, meningioma, ependymomas, neurofibromas, peripheral neuropathy, ophthalmological lesion skin tumours, and hearing loss [227]. Merlin interacts with membrane-associated proteins and transmembrane receptors, where it regu-

lates the formation of membrane domains and acts as a tumour suppressor by modulating signalling, as a scaffold protein, from the transmembrane receptors to the intracellular effectors, controlling cell proliferation and survival [228,229].

A Merlin loss of function is associated with the increased activity of Rac and p21-activated kinases (PAK), and the dysregulation of cytoskeletal organisation [230]. In mouse Schwann cells (MSC), in which *NF2* exon2 is deleted (*NF2^{ΔEx2}*) and Merlin function is lost, the levels of phosphorylated LIMK1, phosphorylated LIMK2, and the subsequent phosphorylated cofilin were upregulated. However, no direct interaction between Merlin and LIMKs has been shown so far. The reintroduction of wild-type *NF2* into these MSCs reduced the LIMK1 and LIMK2 levels. A reduction in the LIMK activity and/or protein levels decreases the *NF2*-deficient MSC viability, and the pharmacological inhibition of LIMKs by BMS5 decreases the viability of *NF2^{ΔEx2}* MSC, blocks the cell cycle progression in the G2/M phase, and decreases AURKA activation [231]. Taken together, these results suggest that LIM kinases play a role in Merlin-loss-driven cytoskeletal dysfunctions and could act as potential therapeutic targets for the treatment of NF2.

6.4. Viral Infections

The three main steps of a viral infection are: (i) its entry into the host cell, (ii) its replication within this cell, and (iii) the release of many virions/viral particles. Viruses need the help of the host cell cytoskeleton to be able to carry out their replication cycle. Thus, they have evolved to hijack the cytoskeletal network and use it to their advantage [232,233]. The LIM kinase implication in the context of viral infection is quite new, but there is evidence that they play a crucial role in the viral life cycle and could be of a therapeutic interest for certain viral infections [234].

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been widely studied over the last years, in particular has its implication in the fine regulation of actin cytoskeleton dynamics during each step of its replication cycle. The actin cytoskeleton has been reported to be involved in viral entry, reverse transcription, nuclear migration, the shuttling of viral components to the membrane, assembly, budding, and cell–cell transfer. Moreover, HIV has developed strategies to spatiotemporally lever the actin cytoskeleton network by upregulating, inhibiting, changing gene expression, cellular localisation, and even modulating the function of certain effectors, such as cofilin and LIMK1 [234,235].

During the course of the HIV-1 infection, cofilin is either inactivated or activated, depending on the step of the viral cycle. During early infection, the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 interacts with the CD4 receptor and CXCR4 (or CCR5) co-receptor, activating RhoA and the Rac-dependent pathway, which leads to LIM kinase activation and cofilin inactivation [236]. Vorster et al. showed that, upon the HIV infection of resting CD4 T cells, a transient phosphorylation and the subsequent activation of LIMK1 is observed within 1 min, followed by a deactivation at 5 min, and a reactivation at 10 min [237]. Moreover, they showed that gp120 alone was sufficient to trigger this activation. The same features were observed in active CD4 T cells and macrophages. This activation of LIMK1 was shown to be mediated by Rac, PAK1, and PAK2, but not by PAK4, RhoA, or Cdc42. When LIMK1 was knockdown in the transformed and primary CD4 T cells, as well as in the stable human CD4 T cell line, CEM-SS, increases in the CXCR4 receptor at the membrane, endocytosis, and exocytosis were observed. Furthermore, the stable knockdown of LIMK1 by shRNA in CD4 T cells renders the T cells resilient against HIV infection [237]. Thus, LIMK1 activation leads to the inhibition of cofilin actin severing activity; hence, for early cortical actin skeleton polymerisation and CD4/CXCR4 receptor clustering, two mechanisms are required for virus entry into the host cell [236]. In the following steps of the HIV-1 infection, there is evidence of viral-driven cofilin dephosphorylation, leading to the depolymerisation of cortical actin, a mechanism by which the viral core penetrates and navigates through the host cell to the nucleus [236,238]. This mechanism seems to be responsible for the establishment of HIV-1 latency in resting CD4 T cells [239]. Indeed, Wu et al. showed an elevated level of activated cofilin in the resting CD4 T cells of the

peripheral blood of patients infected with HIV-1 [240]. Yoder et al. showed that the incubation of T cells with S3 peptide, corresponding to the 16 first amino acids of human cofilin, leads to the decreased activity of LIMK1 on full cofilin, and an enhanced viral replication [238]. These data suggest that the viral replication is increased when the cofilin is less phosphorylated by the LIMK1 and consequently more active [238].

Nef, an actin-modifying HIV-1 protein, was shown to activate LIMK1 by increasing its phosphorylation on its Thr508, leading to an increase in cofilin phosphorylation and resulting in the inhibition of retinoid receptor-mediated reporter activity, which plays a crucial role in immune response [241].

The implication of the actin cytoskeleton in retroviral assembly and budding has also been established [242]. In order to identify new genes involved in HIV-1 virion assembly and release, Wen et al. performed a screening by using a siRNA library and measuring the HIV-1 particle release. LIMK1 and ROCK1 were identified in this screening. They confirmed that, when they depleted the LIMK1 in HeLa cells using siRNA, they observed a reduction in particle output. The same results were obtained with stable HeLa transfected with LIMK1 shRNA. The transfection of a shRNA-resistant FLAG-LIMK1 cDNA, restoring the LIMK1 protein levels, could reverse this effect, whereas the incubation with S3 peptide, a synthetic peptide which acts as a specific competitor for the ADF/cofilin phosphorylation by LIMK1, also leads to a decrease in particle output. ROCK1 is involved in this process, but not PAK1/2/4, as the HeLa cells treated with ROCK siRNA also exhibited a lower particle output. In the HeLa cells silenced for LIMK1, the HIV-1 virions accumulated at the plasma membrane. LIMK1 was shown to co-localise with the HIV-1 particle assembly sites and be incorporated within the HIV particles. Furthermore, the silencing of LIMK1 also resulted in a decrease in the HIV cell transmission from HeLa to the Jurkat cell lines [243]. Altogether, these results show that the ROCK/LIMK/cofilin pathway is involved in the HIV-1 particle release and the spread of the virus.

It is well documented that herpes viruses use cytoskeleton-regulating Rho GTPase signalling pathways during different phases of their replication cycle [244]. Moreover, herpes simplex virus 1 (HSV-1) seems to be able to trigger biphasic cofilin deactivation/activation in a way that is similar to HIV-1, to facilitate its entry into the host cell and its replication in neuronal cells, via RhoA and Cdc42 [245]. Indeed, the interaction between the virus envelope and host cell leads to EGFR/PI3K and Rho/ROCK pathway activation and, ultimately, to actin remodelling. The specific inhibition of these pathways significantly limits the virus infectivity [246]. Amentoflavone, a natural polyphenol compound found in many plants, which has a broad antiviral activity spectrum against several viruses, was tested on HSV-1. The treatment of neuronal cells with Amentoflavone induced a decrease in the phospho-cofilin, leading to an impaired reorganisation of the F-actin and viral infection. Amentoflavone also leads to a decrease in the transport of viral particles from the plasma membrane to the nucleus [247].

As all these studies have highlighted the direct involvement of LIMK1, via its activation, in the viral infection process, inhibitors of LIMK1 have been developed as a new approach to block viral infection. Yi et al. have designed a set of 25 new LIMK inhibitors, and 8 of them appeared to reduce HIV infection [248]. They further characterised their best lead, R10015, and showed that it blocks viral DNA synthesis, viral nuclear migration, and virion release. R10015 was shown to inhibit multiple viruses, including Zaire ebolavirus (EBOV), Rift Valley fever virus (RVFV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), and herpes simplex virus 1 (HSV-1), suggesting that the LIMK implication in the viral life cycle concerns many viruses [248]. Thus, LIMK inhibitors appear as a potential new class of broad-spectrum antiviral drugs.

Furthermore, there is growing evidence about the implication of the HSV-1 infection in the occurrence of neurological diseases such as Alzheimer's disease. As reviewed by Wan et al., HSV-1 DNA co-localises with the senile plaques in AD brains, and some HSV proteins interact with A β and facilitate its production, as well as that of its precursor proteins [249]. Since cofilin dysregulation is a major factor in AD pathogenesis, as well

as in virus infection, it could be the link between HSV-1 infection and AD development. Targeting cofilin or LIMKs could be a new strategy for treating patients infected with HSV-1 and exhibiting AD features.

6.5. Reproduction Troubles

LIMKs have been shown to play a role in the function of the male urogenital system, as well as in its associated defects. All of these features are well described in the review of Pak et al., which belongs to the Special Issue LIM Kinases: From Molecular to Pathological Features [250].

7. Conclusions

Because they are implicated in the dynamics of actin filaments and microtubules, LIM kinases play a crucial role in the remodelling of the cytoskeleton and, thus, in the physiology of the cell. Originally described as being located downstream of several signalling pathways involving members of the Rho family of GTPases, it appeared that LIMKs are, in fact, capable of integrating signals from multiple partners, some of them without an obvious link with their role in the cytoskeleton reorganisation. In fact, LIMKs are at the heart of a complex network of cell signalling pathways. The dysregulation of these interactions has linked them to severe pathologies such as cancer, neurological diseases, and viral infections, making LIMKs a node with strong therapeutic potential (Figure 10). These studies have paved the way for the development of small inhibitory molecules that are capable of modulating the activity of these kinases, but unfortunately, despite promising preliminary results with different mouse models, none have made it through clinical trials. It is now necessary to go further in the direction of understanding the molecular mechanisms that link LIM kinases to the pathogenic phenomenon, and to have a better understanding of their own functioning, in the hope of developing new, tailored, and innovative drugs that target LIM kinases.

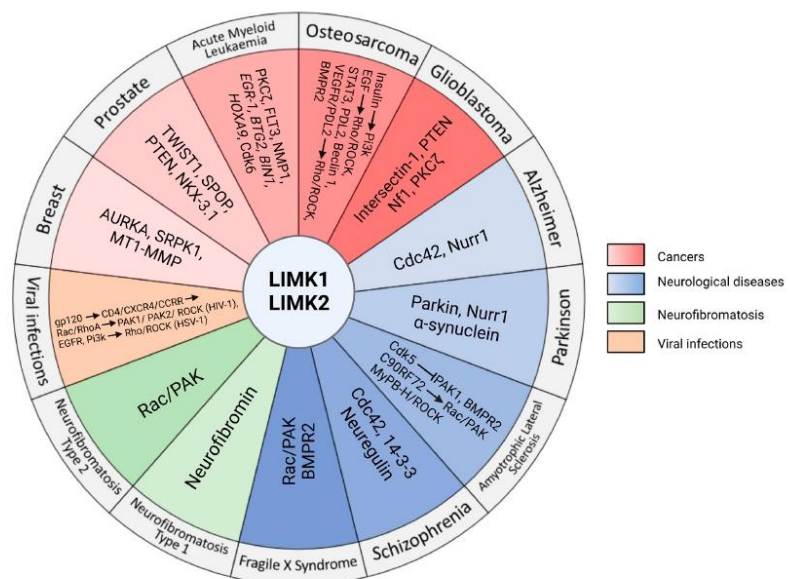


Figure 10. Involvement of LIM kinases in different pathologies. LIMK partners and LIMK mis-regulated signalling pathways implicated into these pathologies are also highlighted.

Author Contributions: Original draft preparation and writing, E.V. and B.V.; reviewing and editing, C.M., T.N., C.G., A.S., B.Ž., M.D., F.G. and H.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, University of Orleans, La Ligue contre le Cancer (grant number PM/FP/202-251), the French Association Neurofibromatosis et Recklinghausen, the French Agence Nationale de la recherche (grant number ANR-19-CE18-0016-02), and the region Centre Val de Loire.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Many thanks to Karen Plé for thorough proofreading of this manuscript. We would like to thank also the RTR Motivhealth, the Ligue contre le Cancer Grand Ouest (comités d'Eure et Loire et du Loiret), Cancéropole Grand Ouest, Réseau Molécules marines, métabolisme et cancer for their support. The figures were created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Mizuno, K.; Okano, I.; Ohashi, K.; Nunoue, K.; Kuma, K.; Miyata, T.; Nakamura, T. Identification of a Human CDNA Encoding a Novel Protein Kinase with Two Repeats of the LIM/Double Zinc Finger Motif. *Oncogene* **1994**, *9*, 1605–1612. [\[PubMed\]](#)
- Bernard, O.; Ganiatsas, S.; Kannourakis, G.; Dringen, R. Kiz-1, a Protein with LIM Zinc Finger and Kinase Domains, Is Expressed Mainly in Neurons. *Cell Growth Differ.* **1994**, *5*, 1159–1171.
- Sumi, T.; Hashigasako, A.; Matsumoto, K.; Nakamura, T. Different Activity Regulation and Subcellular Localization of LIMK1 and LIMK2 during Cell Cycle Transition. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 1021–1030. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Acevedo, K.; Moussi, N.; Li, R.; Soo, P.; Bernard, O. LIM Kinase 2 Is Widely Expressed in All Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **2006**, *54*, 487–501. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Foletta, V.C.; Moussi, N.; Sarmiere, P.D.; Bamburg, J.R.; Bernard, O. LIM Kinase 1, a Key Regulator of Actin Dynamics, Is Widely Expressed in Embryonic and Adult Tissues. *Exp. Cell Res.* **2004**, *294*, 392–405. [\[CrossRef\]](#)
- Pröschel, C.; Blouin, M.J.; Gutowski, N.J.; Ludwig, R.; Noble, M. Limk1 Is Predominantly Expressed in Neural Tissues and Phosphorylates Serine, Threonine and Tyrosine Residues in Vitro. *Oncogene* **1995**, *11*, 1271–1281. [\[PubMed\]](#)
- Sumi, T.; Matsumoto, K.; Takai, Y.; Nakamura, T. Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-Activated Lim-Kinase 2. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 1519–1532. [\[CrossRef\]](#)
- Sumi, T.; Matsumoto, K.; Shibuya, A.; Nakamura, T. Activation of LIM Kinases by Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinase α . *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23092–23096. [\[CrossRef\]](#)
- Arber, S.; Barbayannis, F.A.; Hanser, H.; Schneider, C.; Stanyon, C.A.; Bernard, O.; Caroni, P. Regulation of Actin Dynamics through Phosphorylation of Cofilin by LIM-Kinase. *Nature* **1998**, *393*, 805–809. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, N.; Higuchi, O.; Ohashi, K.; Nagata, K.; Wada, A.; Kangawa, K.; Nishida, E.; Mizuno, K. Cofilin Phosphorylation by LIM-Kinase 1 and Its Role in Rac-Mediated Actin Reorganization. *Nature* **1998**, *393*, 809–812. [\[CrossRef\]](#)
- Gorovoy, M.; Niu, J.; Bernard, O.; Profirovic, J.; Minshall, R.; Neamu, R.; Voyno-Yasenetskaya, T. LIM Kinase 1 Coordinates Microtubule Stability and Actin Polymerization in Human Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26533–26542. [\[CrossRef\]](#)
- Po'uha, S.T.; Shum, M.S.Y.; Goebel, A.; Bernard, O.; Kavallaris, M. LIM-Kinase 2, a Regulator of Actin Dynamics, Is Involved in Mitotic Spindle Integrity and Sensitivity to Microtubule-Destabilizing Drugs. *Oncogene* **2010**, *29*, 597–607. [\[CrossRef\]](#)
- Okano, I.; Hiraoka, J.; Otera, H.; Nunoue, K.; Ohashi, K.; Iwashita, S.; Hirai, M.; Mizuno, K. Identification and Characterization of a Novel Family of Serine/Threonine Kinases Containing Two N-Terminal LIM Motifs. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 31321–31330. [\[CrossRef\]](#)
- Scott, R.W.; Olson, M.F. LIM Kinases: Function, Regulation and Association with Human Disease. *J. Mol. Med.* **2007**, *85*, 555–568. [\[CrossRef\]](#)
- Osada, H.; Hasada, K.; Inazawa, J.; Uchida, K.; Ueda, R.; Takahashi, T.; Takahashi, T. Subcellular Localization and Protein Interaction of the Human LIMK2 Gene Expressing Alternative Transcripts with Tissue-Specific Regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *229*, 582–589. [\[CrossRef\]](#)
- Vallée, B.; Cuberos, H.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gosset, D.; Vourc'h, P.; Andres, C.R.; Bénédicti, H. LIMK2-1, a New Isoform of Human LIMK2, Regulates Actin Cytoskeleton Remodeling via a Different Signaling Pathway than That of Its Two Homologs, LIMK2a and LIMK2b. *Biochem. J.* **2018**, *475*, 3745–3761. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Bénédicti, H. Characterization at the Molecular Level Using Robust Biochemical Approaches of a New Kinase Protein. *JoVE* **2019**, *148*, e59820. [\[CrossRef\]](#)

18. Takahashi, H.; Koshimizu, U.; Miyazaki, J.; Nakamura, T. Impaired Spermatogenic Ability of Testicular Germ Cells in Mice Deficient in the LIM-Kinase 2 Gene. *Dev. Biol.* **2002**, *241*, 259–272. [\[CrossRef\]](#)
19. Takahashi, H.; Koshimizu, U.; Nakamura, T. A Novel Transcript Encoding Truncated LIM Kinase 2 Is Specifically Expressed in Male Germ Cells Undergoing Meiosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *249*, 138–145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Manetti, F. LIM Kinases Are Attractive Targets with Many Macromolecular Partners and Only a Few Small Molecule Regulators: LIM KINASES ARE ATTRACTIVE TARGETS. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 968–998. [\[CrossRef\]](#)
21. Yang, N.; Mizuno, K. Nuclear Export of LIM-Kinase 1, Mediated by Two Leucine-Rich Nuclear-Export Signals within the PDZ Domain. *Biochem. J.* **1999**, *338*, 793–798. [\[CrossRef\]](#)
22. Goyal, P.; Pandey, D.; Siess, W. Phosphorylation-Dependent Regulation of Unique Nuclear and Nucleolar Localization Signals of LIM Kinase 2 in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25223–25230. [\[CrossRef\]](#)
23. Chatterjee, D.; Preuss, F.; Dederer, V.; Knapp, S.; Mathea, S. Structural Aspects of LIMK Regulation and Pharmacology. *Cells* **2022**, *11*, 142. [\[CrossRef\]](#)
24. Nadella, K.S.; Saji, M.; Jacob, N.K.; Pavel, E.; Ringel, M.D.; Kirschner, L.S. Regulation of Actin Function by Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of Limk1. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 599–605. [\[CrossRef\]](#)
25. Kobayashi, M.; Nishita, M.; Mishima, T.; Ohashi, K.; Mizuno, K. MAPKAPK-2-Mediated LIM-Kinase Activation Is Critical for VEGF-Induced Actin Remodeling and Cell Migration. *EMBO J.* **2006**, *25*, 713–726. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Hsu, F.-F.; Lin, T.-Y.; Chen, J.-Y.; Shieh, S.-Y. P53-Mediated Transactivation of LIMK2b Links Actin Dynamics to Cell Cycle Checkpoint Control. *Oncogene* **2010**, *29*, 2864–2876. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Croft, D.R.; Crighton, D.; Samuel, M.S.; Lourenco, F.C.; Munro, J.; Wood, J.; Bensaad, K.; Vousden, K.H.; Sansom, O.J.; Ryan, K.M.; et al. P53-Mediated Transcriptional Regulation and Activation of the Actin Cytoskeleton Regulatory RhoC to LIMK2 Signaling Pathway Promotes Cell Survival. *Cell Res.* **2011**, *21*, 666–682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Birkenfeld, J.; Betz, H.; Roth, D. Identification of Cofilin and LIM-Domain-Containing Protein Kinase 1 as Novel Interaction Partners of 14-3-3 Zeta. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 45–54. [\[CrossRef\]](#)
29. Gohla, A.; Bokoch, G.M. 14-3-3 Regulates Actin Dynamics by Stabilizing Phosphorylated Cofilin. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1704–1710. [\[CrossRef\]](#)
30. Vlachos, P.; Joseph, B. The Cdk Inhibitor P57Kip2 Controls LIM-Kinase 1 Activity and Regulates Actin Cytoskeleton Dynamics. *Oncogene* **2009**, *28*, 4175–4188. [\[CrossRef\]](#)
31. Yokoo, T.; Toyoshima, H.; Miura, M.; Wang, Y.; Iida, K.T.; Suzuki, H.; Sone, H.; Shimano, H.; Gotoda, T.; Nishimori, S.; et al. P57Kip2 Regulates Actin Dynamics by Binding and Translocating LIM-Kinase 1 to the Nucleus. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52919–52923. [\[CrossRef\]](#)
32. Dong, Q.; Ji, Y.-S.; Cai, C.; Chen, Z.-Y. LIM Kinase 1 (LIMK1) Interacts with Tropomyosin-Related Kinase B (TrkB) and Mediates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)-Induced Axonal Elongation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 41720–41731. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Johnson, E.O.; Chang, K.-H.; Ghosh, S.; Venkatesh, C.; Giger, K.; Low, P.S.; Shah, K. LIMK2 Is a Crucial Regulator and Effector of Aurora-A-Kinase-Mediated Malignancy. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 1204–1216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Ding, Y.; Milosavljevic, T.; Alahari, S.K. Nischarin Inhibits LIM Kinase To Regulate Cofilin Phosphorylation and Cell Invasion. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 3742–3756. [\[CrossRef\]](#)
35. Jain, P.; Baranwal, S.; Dong, S.; Struckhoff, A.P.; Worthylake, R.A.; Alahari, S.K. Integrin-Binding Protein Nischarin Interacts with Tumor Suppressor Liver Kinase B1 (LKB1) to Regulate Cell Migration of Breast Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 15495–15509. [\[CrossRef\]](#)
36. Yang, X.; Yu, K.; Hao, Y.; Li, D.; Stewart, R.; Insogna, K.L.; Xu, T. LATS1 Tumour Suppressor Affects Cytokinesis by Inhibiting LIMK1. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 609–617. [\[CrossRef\]](#)
37. Soosairajah, J.; Maiti, S.; Wiggan, O.; Sarmiere, P.; Moussi, N.; Sarcevic, B.; Sampath, R.; Bamberg, J.R.; Bernard, O. Interplay between Components of a Novel LIM Kinase–Slingshot Phosphatase Complex Regulates Cofilin. *EMBO J.* **2005**, *24*, 473–486. [\[CrossRef\]](#)
38. Zoudilova, M.; Kumar, P.; Ge, L.; Wang, P.; Bokoch, G.M.; DeFea, K.A. β -Arrestin-Dependent Regulation of the Cofilin Pathway Downstream of Protease-Activated Receptor-2. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 20634–20646. [\[CrossRef\]](#)
39. Tursun, B.; Schlüter, A.; Peters, M.A.; Viehweger, B.; Ostendorff, H.P.; Soosairajah, J.; Drung, A.; Bossenz, M.; Johnsen, S.A.; Schweizer, M.; et al. The Ubiquitin Ligase Rnf6 Regulates Local LIM Kinase 1 Levels in Axonal Growth Cones. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2307–2319. [\[CrossRef\]](#)
40. Chen, X.; Macara, I.G. Par-3 Mediates the Inhibition of LIM Kinase 2 to Regulate Cofilin Phosphorylation and Tight Junction Assembly. *J. Cell Biol.* **2006**, *172*, 671–678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Sacchetti, P.; Carpentier, R.; Ségard, P.; Olivé-Cren, C.; Lefebvre, P. Multiple Signaling Pathways Regulate the Transcriptional Activity of the Orphan Nuclear Receptor NURR1. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5515–5527. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Jayo, A.; Parsons, M.; Adams, J.C. A Novel Rho-Dependent Pathway That Drives Interaction of Fascin-1 with p-Lin-11/Isl-1/Mec-3 Kinase (LIMK) 1/2 to Promote Fascin-1/Actin Binding and Filopodia Stability. *BMC Biol.* **2012**, *10*, 72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Schofield, A.V.; Steel, R.; Bernard, O. Rho-Associated Coiled-Coil Kinase (ROCK) Protein Controls Microtubule Dynamics in a Novel Signaling Pathway That Regulates Cell Migration. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43620–43629. [\[CrossRef\]](#)

44. Janke, C.; Montagnac, G. Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, R1287–R1292. [\[CrossRef\]](#)
45. Schofield, A.V.; Gamell, C.; Bernard, O. LIMK1/TPPP1/HDAC6 Is a Dual Actin and Microtubule Regulatory Complex That Promotes Drug Resistance. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2014**, *05*, 353–362. [\[CrossRef\]](#)
46. Yang, E.J.; Yoon, J.-H.; Min, D.S.; Chung, K.C. LIM Kinase 1 Activates CAMP-Responsive Element-Binding Protein during the Neuronal Differentiation of Immortalized Hippocampal Progenitor Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8903–8910. [\[CrossRef\]](#)
47. Côté, M.C.; Lavoie, J.R.; Houle, F.; Poirier, A.; Rousseau, S.; Huot, J. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration by LIM Kinase 1-Mediated Phosphorylation of Annexin 1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8013–8021. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. White-Grindley, E.; Li, L.; Mohammad Khan, R.; Ren, F.; Saraf, A.; Florens, L.; Si, K. Contribution of Orb2A Stability in Regulated Amyloid-Like Oligomerization of Drosophila Orb2. *PLoS Biol.* **2014**, *12*, e1001786. [\[CrossRef\]](#)
49. Lagoutte, E.; Villeneuve, C.; Lafanechère, L.; Wells, C.M.; Jones, G.E.; Chavrier, P.; Rossé, C. LIMK Regulates Tumor-Cell Invasion and Matrix Degradation Through Tyrosine Phosphorylation of MT1-MMP. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24925. [\[CrossRef\]](#)
50. Svitkina, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a018267. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Ridley, A.J. Rho GTPase Signalling in Cell Migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *36*, 103–112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Lawson, C.D.; Ridley, A.J. Rho GTPase Signaling Complexes in Cell Migration and Invasion. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 447–457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Seetharaman, S.; Etienne-Manneville, S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends. Cell Biol.* **2020**, *30*, 720–735. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Zebda, N.; Bernard, O.; Bailly, M.; Welti, S.; Lawrence, D.S.; Condeelis, J.S. Phosphorylation of Adf/Cofilin Abolishes Egf-Induced Actin Nucleation at the Leading Edge and Subsequent Lamellipod Extension. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 1119–1128. [\[CrossRef\]](#)
55. Nishita, M.; Tomizawa, C.; Yamamoto, M.; Horita, Y.; Ohashi, K.; Mizuno, K. Spatial and Temporal Regulation of Cofilin Activity by LIM Kinase and Slingshot Is Critical for Directional Cell Migration. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 349–359. [\[CrossRef\]](#)
56. Nishita, M.; Aizawa, H.; Mizuno, K. Stromal Cell-Derived Factor 1 α Activates LIM Kinase 1 and Induces Cofilin Phosphorylation for T-Cell Chemotaxis. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 774–783. [\[CrossRef\]](#)
57. Chan, A.Y.; Raft, S.; Bailly, M.; Wyckoff, J.B.; Segall, J.E.; Condeelis, J.S. EGF Stimulates an Increase in Actin Nucleation and Filament Number at the Leading Edge of the Lamellipod in Mammary Adenocarcinoma Cells. *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 199–211. [\[CrossRef\]](#)
58. Yoshioka, K.; Foletta, V.; Bernard, O.; Itoh, K. A Role for LIM Kinase in Cancer Invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7247–7252. [\[CrossRef\]](#)
59. You, T.; Gao, W.; Wei, J.; Jin, X.; Zhao, Z.; Wang, C.; Li, Y. Overexpression of LIMK1 Promotes Tumor Growth and Metastasis in Gastric Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2015**, *69*, 96–101. [\[CrossRef\]](#)
60. Chen, J.; Ananthanarayanan, B.; Springer, K.S.; Wolf, K.J.; Sheyman, S.M.; Tran, V.D.; Kumar, S. Suppression of LIM Kinase 1 and LIM Kinase 2 Limits Glioblastoma Invasion. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 69–78. [\[CrossRef\]](#)
61. Zhang, H.; Wang, Y.; Xing, F.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, H.; Yang, Y.; Gao, Z. Overexpression of LIMK1 Promotes Migration Ability of Multidrug-Resistant Osteosarcoma Cells. *Oncol. Res.* **2011**, *19*, 501–509. [\[CrossRef\]](#)
62. Berabez, R.; Routier, S.; Bénédicti, H.; Plé, K.; Vallée, B. LIM Kinases, Promising but Reluctant Therapeutic Targets: Chemistry and Preclinical Validation In Vivo. *Cells* **2022**, *11*, 2090. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Rizzelli, F.; Malabarba, M.G.; Sigismund, S.; Mapelli, M. The Crosstalk between Microtubules, Actin and Membranes Shapes Cell Division. *Open Biol.* **2020**, *10*, 190314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Chakrabarti, R.; Jones, J.L.; Oelschlager, D.K.; Tapia, T.; Tousson, A.; Grizzle, W.E. Phosphorylated LIM Kinases Colocalize with Gamma-Tubulin in Centrosomes During Early Stages of Mitosis. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 2944–2952. [\[CrossRef\]](#)
65. Kaji, N.; Ohashi, K.; Shuin, M.; Niwa, R.; Uemura, T.; Mizuno, K. Cell Cycle-Associated Changes in Slingshot Phosphatase Activity and Roles in Cytokinesis in Animal Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33450–33455. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Sumi, T.; Matsumoto, K.; Nakamura, T. Mitosis-Dependent Phosphorylation and Activation of LIM-Kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 1315–1320. [\[CrossRef\]](#)
67. Amano, T.; Kaji, N.; Ohashi, K.; Mizuno, K. Mitosis-Specific Activation of LIM Motif-Containing Protein Kinase and Roles of Cofilin Phosphorylation and Dephosphorylation in Mitosis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22093–22102. [\[CrossRef\]](#)
68. Kaji, N.; Muramoto, A.; Mizuno, K. LIM Kinase-Mediated Cofilin Phosphorylation during Mitosis Is Required for Precise Spindle Positioning. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 4983–4992. [\[CrossRef\]](#)
69. Ou, S.; Tan, M.-H.; Weng, T.; Li, H.; Koh, C.-G. LIM Kinase1 Regulates Mitotic Centrosome Integrity via Its Activity on Dynein Light Intermediate Chains. *Open Biol.* **2018**, *8*, 170202. [\[CrossRef\]](#)
70. Prudent, R.; Vassal-Stermann, E.; Nguyen, C.-H.; Pillet, C.; Martinez, A.; Prunier, C.; Barette, C.; Soleilhac, E.; Filhol, O.; Beghin, A.; et al. Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Stabilizes Microtubules and Inhibits Neoplastic Growth. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 4429–4439. [\[CrossRef\]](#)
71. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [\[CrossRef\]](#)
72. Ren, W.; Zhao, W.; Cao, L.; Huang, J. Involvement of the Actin Machinery in Programmed Cell Death. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 634849. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

73. Tomiyoshi, G.; Horita, Y.; Nishita, M.; Ohashi, K.; Mizuno, K. Caspase-Mediated Cleavage and Activation of LIM-Kinase 1 and Its Role in Apoptotic Membrane Blebbing. *Genes Cells* **2004**, *9*, 591–600. [\[CrossRef\]](#)
74. Papadopoulou, N.; Charalampopoulos, I.; Alevizopoulos, K.; Gravanis, A.; Stourmaras, C. Rho/ROCK/Actin Signaling Regulates Membrane Androgen Receptor Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 3162–3174. [\[CrossRef\]](#)
75. Ivanovska, J.; Tregubova, A.; Mahadevan, V.; Chakilam, S.; Gandesiri, M.; Benderska, N.; Ettle, B.; Hartmann, A.; Söder, S.; Ziesché, E.; et al. Identification of DAPK as a Scaffold Protein for the LIMK/Cofilin Complex in TNF-Induced Apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 1720–1729. [\[CrossRef\]](#)
76. Kavanagh, E.; Vlachos, P.; Emourgeon, V.; Rodhe, J.; Joseph, B. P57KIP2 Control of Actin Cytoskeleton Dynamics Is Responsible for Its Mitochondrial Pro-Apoptotic Effect. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Dan, S.; Tsunoda, T.; Kitahara, O.; Yanagawa, R.; Zembutsu, H.; Katagiri, T.; Yamazaki, K.; Nakamura, Y.; Yamori, T. An Integrated Database of Chemosensitivity to 55 Anticancer Drugs and Gene Expression Profiles of 39 Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1139–1147. [\[PubMed\]](#)
78. Kim, J.-E.; Ryu, H.J.; Kim, M.J.; Kang, T.-C. LIM Kinase-2 Induces Programmed Necrotic Neuronal Death via Dysfunction of DRP1-Mediated Mitochondrial Fission. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1036–1049. [\[CrossRef\]](#)
79. Ko, A.-R.; Hyun, H.-W.; Min, S.-J.; Kim, J.-E.; Kang, T.-C. Endothelin-1 Induces LIMK2-Mediated Programmed Necrotic Neuronal Death Independent of NOS Activity. *Mol. Brain* **2015**, *8*, 58. [\[CrossRef\]](#)
80. Ribba, A.-S.; Fraboulet, S.; Sadoul, K.; Lafanechère, L. The Role of LIM Kinases during Development: A Lens to Get a Glimpse of Their Implication in Pathologies. *Cells* **2022**, *11*, 403. [\[CrossRef\]](#)
81. Cuberos, H.; Vallée, B.; Vourc'h, P.; Tastet, J.; Andres, C.R.; Bénédicti, H. Roles of LIM Kinases in Central Nervous System Function and Dysfunction. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3795–3806. [\[CrossRef\]](#)
82. Ben Zablah, Y.; Zhang, H.; Gugustea, R.; Jia, Z. LIM-Kinases in Synaptic Plasticity, Memory, and Brain Diseases. *Cells* **2021**, *10*, 2079. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Halasz, E.; Townes-Anderson, E.; Wang, W. LIM Kinases in Synaptic Plasticity and Their Potential as Therapeutic Targets. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 1471. [\[CrossRef\]](#)
84. Meng, Y.; Zhang, Y.; Tregoubov, V.; Janus, C.; Cruz, L.; Jackson, M.; Lu, W.Y.; MacDonald, J.F.; Wang, J.Y.; Falls, D.L.; et al. Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice. *Neuron* **2002**, *35*, 121–133. [\[CrossRef\]](#)
85. Meng, Y.; Takahashi, H.; Meng, J.; Zhang, Y.; Lu, G.; Asrar, S.; Nakamura, T.; Jia, Z. Regulation of ADF/Cofilin Phosphorylation and Synaptic Function by LIM-Kinase. *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 746–754. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Wang, Y.; Zeng, C.; Li, J.; Zhou, Z.; Ju, X.; Xia, S.; Li, Y.; Liu, A.; Teng, H.; Zhang, K.; et al. PAK2 Haploinsufficiency Results in Synaptic Cytoskeleton Impairment and Autism-Related Behavior. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 2029–2041. [\[CrossRef\]](#)
87. Hayashi, M.L.; Choi, S.-Y.; Rao, B.S.S.; Jung, H.-Y.; Lee, H.-K.; Zhang, D.; Chattarji, S.; Kirkwood, A.; Tonegawa, S. Altered Cortical Synaptic Morphology and Impaired Memory Consolidation in Forebrain-Specific Dominant-Negative PAK Transgenic Mice. *Neuron* **2004**, *42*, 773–787. [\[CrossRef\]](#)
88. Zhou, Z.; Meng, Y.; Asrar, S.; Todorovski, Z.; Jia, Z. A Critical Role of Rho-Kinase ROCK2 in the Regulation of Spine and Synaptic Function. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 81–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Todorovski, Z.; Asrar, S.; Liu, J.; Saw, N.M.N.; Joshi, K.; Cortez, M.A.; Snead, O.C.; Xie, W.; Jia, Z. LIMK1 Regulates Long-Term Memory and Synaptic Plasticity via the Transcriptional Factor CREB. *Mol. Cell Biol.* **2015**, *35*, 1316–1328. [\[CrossRef\]](#)
90. Rosso, S.; Bollati, F.; Bisbal, M.; Peretti, D.; Sumi, T.; Nakamura, T.; Quiroga, S.; Ferreira, A.; Cáceres, A. LIMK1 Regulates Golgi Dynamics, Traffic of Golgi-Derived Vesicles, and Process Extension in Primary Cultured Neurons. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 3433–3449. [\[CrossRef\]](#)
91. Salvarezza, S.B.; Deborde, S.; Schreiner, R.; Campagne, F.; Kessels, M.M.; Qualmann, B.; Cáceres, A.; Kreitzer, G.; Rodríguez-Boulán, E. LIM Kinase 1 and Cofilin Regulate Actin Filament Population Required for Dynamin-Dependent Apical Carrier Fission from the Trans-Golgi Network. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 438–451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Davila, M.; Frost, A.R.; Grizzle, W.E.; Chakrabarti, R. LIM Kinase 1 Is Essential for the Invasive Growth of Prostate Epithelial Cells: Implications in Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36868–36875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Nikhil, K.; Chang, L.; Viccaro, K.; Jacobsen, M.; McGuire, C.; Satapathy, S.R.; Tandiyar, M.; Broman, M.M.; Cresswell, G.; He, Y.; et al. Identification of LIMK2 as a Therapeutic Target in Castration Resistant Prostate Cancer. *Cancer Lett.* **2019**, *448*, 182–196. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Okamoto, I.; Pirker, C.; Bilban, M.; Berger, W.; Losert, D.; Marosi, C.; Haas, O.A.; Wolff, K.; Pehamberger, H. Seven Novel and Stable Translocations Associated with Oncogenic Gene Expression in Malignant Melanoma. *Neoplasia* **2005**, *7*, 303–311. [\[CrossRef\]](#)
95. Narayan, A.K.; Lee, C.I.; Lehman, C.D. Screening for Breast Cancer. *Med. Clin. N. Am.* **2020**, *104*, 1007–1021. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. Malvi, P.; Janostiak, R.; Chava, S.; Manrai, P.; Yoon, E.; Singh, K.; Harigopal, M.; Gupta, R.; Wajapeyee, N. LIMK2 Promotes the Metastatic Progression of Triple-Negative Breast Cancer by Activating SRPK1. *Oncogenesis* **2020**, *9*, 77. [\[CrossRef\]](#)
97. Carvajal, R.D.; Tse, A.; Schwartz, G.K. Aurora Kinases: New Targets for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6869–6875. [\[CrossRef\]](#)
98. Lin, J.-C.; Lin, C.-Y.; Tarn, W.-Y.; Li, F.-Y. Elevated SRPK1 Lessens Apoptosis in Breast Cancer Cells through RBM4-Regulated Splicing Events. *RNA* **2014**, *20*, 1621–1631. [\[CrossRef\]](#)
99. Wang, C.; Zhou, Z.; Subhramanyam, C.S.; Cao, Q.; Heng, Z.S.L.; Liu, W.; Fu, X.; Hu, Q. SRPK1 Acetylation Modulates Alternative Splicing to Regulate Cisplatin Resistance in Breast Cancer Cells. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 268. [\[CrossRef\]](#)

100. van Roosmalen, W.; Le Dévédec, S.E.; Golani, O.; Smid, M.; Pulyakhina, I.; Timmermans, A.M.; Look, M.P.; Zi, D.; Pont, C.; de Graauw, M.; et al. Tumor Cell Migration Screen Identifies SRPK1 as Breast Cancer Metastasis Determinant. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 1648–1664. [\[CrossRef\]](#)
101. Prunier, C.; Josserand, V.; Vollaie, J.; Beerling, E.; Petropoulos, C.; Destaing, O.; Montemagno, C.; Hurbin, A.; Prudent, R.; de Koning, L.; et al. LIM Kinase Inhibitor Pyr1 Reduces the Growth and Metastatic Load of Breast Cancers. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3541–3552. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#)
103. Nikhil, K.; Haymour, H.S.; Kamra, M.; Shah, K. Phosphorylation-Dependent Regulation of SPOP by LIMK2 Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer. *Br. J. Cancer* **2021**, *124*, 995–1008. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Nikhil, K.; Kamra, M.; Raza, A.; Haymour, H.S.; Shah, K. Molecular Interplay between AURKA and SPOP Dictates CRPC Pathogenesis via Androgen Receptor. *Cancers* **2021**, *12*, 3247. [\[CrossRef\]](#)
105. Soorshjani, M.A.; Nikhil, K.; Kamra, M.; Nguyen, D.N.; Kumar, D.; Shah, K. LIMK2-NKX3.1 Engagement Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 2324. [\[CrossRef\]](#)
106. Zhao, Z.; Rahman, M.A.; Chen, Z.G.; Shin, D.M. Multiple Biological Functions of Twist1 in Various Cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20380–20393. [\[CrossRef\]](#)
107. Goodwin, N.C.; Cianchetta, G.; Burgoon, H.A.; Healy, J.; Mabon, R.; Strobel, E.D.; Allen, J.; Wang, S.; Hamman, B.D.; Rawlins, D.B. Discovery of a Type III Inhibitor of LIM Kinase 2 That Binds in a DFG-Out Conformation. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 53–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Song, Y.; Xu, Y.; Pan, C.; Yan, L.; Wang, Z.; Zhu, X. The Emerging Role of SPOP Protein in Tumorigenesis and Cancer Therapy. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 2. [\[CrossRef\]](#)
109. Nikhil, K.; Kamra, M.; Raza, A.; Shah, K. Negative Cross Talk between LIMK2 and PTEN Promotes Castration Resistant Prostate Cancer Pathogenesis in Cells and in Vivo. *Cancer Lett.* **2021**, *498*, 1–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Bowen, C.; Ostrowski, M.C.; Leone, G.; Gelmann, E.P. Loss of PTEN Accelerates NKX3.1 Degradation to Promote Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4124–4134. [\[CrossRef\]](#)
111. Mardilovich, K.; Baugh, M.; Crighton, D.; Kowalczyk, D.; Gabrielsen, M.; Munro, J.; Croft, D.R.; Lourenco, F.; James, D.; Kalna, G.; et al. LIM Kinase Inhibitors Disrupt Mitotic Microtubule Organization and Impair Tumor Cell Proliferation. *Oncotarget* **2015**, *6*, 38469–38486. [\[CrossRef\]](#)
112. Fujituchi, Y.; Nagakawa, O.; Murakami, K.; Fuse, H.; Saiki, I. Effect of Hepatocyte Growth Factor on Invasion of Prostate Cancer Cell Lines. *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1001–1006. [\[CrossRef\]](#)
113. Wells, C.M.; Ahmed, T.; Masters, J.R.W.; Jones, G.E. Rho Family GTPases Are Activated during HGF-Stimulated Prostate Cancer-Cell Scattering. *Cell Motil. Cytoskelet.* **2005**, *62*, 180–194. [\[CrossRef\]](#)
114. Ahmed, T.; Shea, K.; Masters, J.R.W.; Jones, G.E.; Wells, C.M. A PAK4-LIMK1 Pathway Drives Prostate Cancer Cell Migration Downstream of HGF. *Cell Signal* **2008**, *20*, 1320–1328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Juliusson, G.; Hough, R. Leukemia. In *Progress in Tumor Research*; Stark, D.P., Vassal, G., Eds.; S. Karger AG: Basel, Switzerland, 2016; Volume 43, pp. 87–100. ISBN 978-3-318-05911-3.
116. Guo, H.; Gu, F.; Li, W.; Zhang, B.; Niu, R.; Fu, L.; Zhang, N.; Ma, Y. Reduction of Protein Kinase C Zeta Inhibits Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells. *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 203–213. [\[CrossRef\]](#)
117. Jensen, P.; Carlet, M.; Schlenk, R.F.; Weber, A.; Kress, J.; Brunner, I.; Slabicki, M.; Grill, G.; Weisemann, S.; Cheng, Y.-Y.; et al. Requirement for LIM Kinases in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* **2020**, *34*, 3173–3185. [\[CrossRef\]](#)
118. Ross-Macdonald, P.; de Silva, H.; Guo, Q.; Xiao, H.; Hung, C.-Y.; Penhallow, B.; Markwalder, J.; He, L.; Attar, R.M.; Lin, T.; et al. Identification of a Nonkinase Target Mediating Cytotoxicity of Novel Kinase Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 3490–3498. [\[CrossRef\]](#)
119. Oku, Y.; Tareyanagi, C.; Takaya, S.; Osaka, S.; Ujiie, H.; Yoshida, K.; Nishiya, N.; Uehara, Y. Multimodal Effects of Small Molecule ROCK and LIMK Inhibitors on Mitosis, and Their Implication as Anti-Leukemia Agents. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
120. Djamai, H.; Berrou, J.; Dupont, M.; Kaci, A.; Ehlert, J.E.; Weber, H.; Baruchel, A.; Paublant, F.; Prudent, R.; Gardin, C.; et al. Synergy of FLT3 Inhibitors and the Small Molecule Inhibitor of LIM Kinase1/2 CEL-Amide in FLT3-ITD Mutated Acute Myeloblastic Leukemia (AML) Cells. *Leuk. Res.* **2021**, *100*, 106490. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
121. Berrou, J.; Dupont, M.; Djamai, H.; Adicéam, E.; Parietti, V.; Kaci, A.; Clappier, E.; Cayuela, J.-M.; Baruchel, A.; Paublant, F.; et al. Preclinical Evaluation of a Novel Small Molecule Inhibitor of LIM Kinases (LIMK) CEL-Amide in Philadelphia-Chromosome Positive (BCR::ABL+) Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 6761. [\[CrossRef\]](#)
122. Brion, R.; Regnier, L.; Mullard, M.; Amiaud, J.; Rédini, F.; Verrecchia, F. LIM Kinases in Osteosarcoma Development. *Cells* **2021**, *10*, 3542. [\[CrossRef\]](#)
123. Ritter, J.; Bielack, S.S. Osteosarcoma. *Ann. Oncol.* **2010**, *21*, vii320–vii325. [\[CrossRef\]](#)
124. Zhang, H.-S.; Zhao, J.-W.; Wang, H.; Zhang, H.-Y.; Ji, Q.-Y.; Meng, L.-J.; Xing, F.-J.; Yang, S.-T.; Wang, Y. LIM Kinase 1 Is Required for Insulin-Dependent Cell Growth of Osteosarcoma Cell Lines. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *9*, 103–108. [\[CrossRef\]](#)
125. Li, Z.; Yao, Y.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Liu, Z.; Hu, P.; Zhu, Z. Effects of PAK4/LIMK1/Cofilin-1 Signaling Pathway on Proliferation, Invasion, and Migration of Human Osteosarcoma Cells. *J. Clin. Lab. Anal.* **2020**, *34*, e23362. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

126. Yang, J.; Huang, L.; Chen, R.; Meng, L.; Gao, Y.; Ji, Q.; Wang, Y. LIM Kinase 1 Serves an Important Role in the Multidrug Resistance of Osteosarcoma Cells. *Oncol. Lett.* **2017**, *15*, 250–256. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
127. Wang, J.; Zhang, L.; Qu, R.; Zhang, L.; Huang, W. Rho A Regulates Epidermal Growth Factor-Induced Human Osteosarcoma MG63 Cell Migration. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1437. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
128. Ren, T.; Zheng, B.; Huang, Y.; Wang, S.; Bao, X.; Liu, K.; Guo, W. Osteosarcoma Cell Intrinsic PD-L2 Signals Promote Invasion and Metastasis via the RhoA-ROCK-LIMK2 and Autophagy Pathways. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 261. [\[CrossRef\]](#)
129. Zheng, B.; Zhou, C.; Qu, G.; Ren, C.; Yan, P.; Guo, W.; Yue, B. VEGFR2 Promotes Metastasis and PD-L2 Expression of Human Osteosarcoma Cells by Activating the STAT3 and RhoA-ROCK-LIMK2 Pathways. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 543562. [\[CrossRef\]](#)
130. Wang, G.; Sun, M.; Jiang, Y.; Zhang, T.; Sun, W.; Wang, H.; Yin, F.; Wang, Z.; Sang, W.; Xu, J.; et al. Anlotinib, a Novel Small Molecular Tyrosine Kinase Inhibitor, Suppresses Growth and Metastasis via Dual Blockade of VEGFR2 and MET in Osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 979–993. [\[CrossRef\]](#)
131. Wang, S.; Ren, T.; Jiao, G.; Huang, Y.; Bao, X.; Zhang, F.; Liu, K.; Zheng, B.; Sun, K.; Guo, W. BMPR2 Promotes Invasion and Metastasis via the RhoA-ROCK-LIMK2 Pathway in Human Osteosarcoma Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 58625–58641. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
132. Foletta, V.C.; Lim, M.A.; Soosairaiyah, J.; Kelly, A.P.; Stanley, E.G.; Shannon, M.; He, W.; Das, S.; Massagué, J.; Bernard, O. Direct Signaling by the BMP Type II Receptor via the Cytoskeletal Regulator LIMK. *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 1089–1098. [\[CrossRef\]](#)
133. Yang, J.-Z.; Ma, S.-R.; Rong, X.-L.; Zhu, M.-J.; Ji, Q.-Y.; Meng, L.-J.; Gao, Y.-Y.; Yang, Y.-D.; Wang, Y. Characterization of Multidrug-Resistant Osteosarcoma Sublines and the Molecular Mechanisms of Resistance. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 3269–3276. [\[CrossRef\]](#)
134. Zhang, M.; Chen, L.; Liu, Y.; Chen, M.; Zhang, S.; Kong, D. Sea Cucumber Cucumaria Frondosa Fucoidan Inhibits Osteosarcoma Adhesion and Migration by Regulating Cytoskeleton Remodeling. *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 469–476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Yoshizawa, M.; Nakamura, S.; Sugiyama, Y.; Tamai, S.; Ishida, Y.; Sueyoshi, M.; Toda, Y.; Hosogi, S.; Yano, Y.; Ashihara, E. 6-Hydroxythiobinupharidine Inhibits Migration of LM8 Osteosarcoma Cells by Decreasing Expression of LIM Domain Kinase 1. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 6507–6513. [\[CrossRef\]](#)
136. Davis, M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **2016**, *20*, S2–S8. [\[CrossRef\]](#)
137. Park, J.-B.; Agnihotri, S.; Golbourn, B.; Bertrand, K.C.; Luck, A.; Sabha, N.; Smith, C.A.; Byron, S.; Zadeh, G.; Croul, S.; et al. Transcriptional Profiling of GBM Invasion Genes Identifies Effective Inhibitors of the LIM Kinase-Cofilin Pathway. *Oncotarget* **2014**, *5*, 9382–9395. [\[CrossRef\]](#)
138. Schulze, M.; Fedorchenko, O.; Zink, T.G.; Knobbe-Thomsen, C.B.; Kraus, S.; Schwinn, S.; Beilhack, A.; Reifenberger, G.; Monoranu, C.M.; Sirén, A.-L.; et al. Chronophin Is a Glial Tumor Modifier Involved in the Regulation of Glioblastoma Growth and Invasiveness. *Oncogene* **2016**, *35*, 3163–3177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
139. Erkutlu, I.; Cigiloglu, A.; Kalender, M.E.; Alptekin, M.; Demiryurek, A.T.; Suner, A.; Ozkaya, E.; Ulasli, M.; Camci, C.; Ulasli, M.; et al. Correlation between Rho-Kinase Pathway Gene Expressions and Development and Progression of Glioblastoma Multiforme. *Tumour Biol.* **2013**, *34*, 1139–1144. [\[CrossRef\]](#)
140. Ma, Y.; Wang, B.; Li, W.; Liu, X.; Wang, J.; Ding, T.; Zhang, J.; Ying, G.; Fu, L.; Gu, F. Intersectin1-s Is Involved in Migration and Invasion of Human Glioma Cells. *J. Neurosci. Res.* **2011**, *89*, 1079–1090. [\[CrossRef\]](#)
141. Koul, D. PTEN Signaling Pathways in Glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 1321–1325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
142. Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gombault, A.; Tchalikian, A.; de Tazua, M.-L.; Bénédicti, H. Nf1 RasGAP Inhibition of LIMK2 Mediates a New Cross-Talk between Ras and Rho Pathways. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47283. [\[CrossRef\]](#)
143. Starinsky-Elbaz, S.; Faigenbloom, L.; Friedman, E.; Stein, R.; Kloog, Y. The Pre-GAP-Related Domain of Neurofibromin Regulates Cell Migration through the LIM Kinase/Cofilin Pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* **2009**, *42*, 278–287. [\[CrossRef\]](#)
144. Schulze, M.; Hutterer, M.; Sabo, A.; Hoja, S.; Lorenz, J.; Rothhammer-Hampl, T.; Herold-Mende, C.; Floßbach, L.; Monoranu, C.; Riemenschneider, M.J. Chronophin Regulates Active Vitamin B6 Levels and Transcriptomic Features of Glioblastoma Cell Lines Cultured under Non-Adherent, Serum-Free Conditions. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 524. [\[CrossRef\]](#)
145. Wang, X.; Zou, S.; Ren, T.; Zhao, L.-J.; Yu, L.-F.; Li, X.-Y.; Yan, X.; Zhang, L.-J. Alantolactone Suppresses the Metastatic Phenotype and Induces the Apoptosis of Glioblastoma Cells by Targeting LIMK Kinase Activity and Activating the Cofilin/G-actin Signaling Cascade. *Int. J. Mol. Med.* **2021**, *47*, 68. [\[CrossRef\]](#)
146. Hou, Y.; Zhou, L.; Yang, Q.D.; Du, X.P.; Li, M.; Yuan, M.; Zhou, Z.W. Changes in Hippocampal Synapses and Learning-Memory Abilities in a Streptozotocin-Treated Rat Model and Intervention by Using Fasudil Hydrochloride. *Neuroscience* **2012**, *200*, 120–129. [\[CrossRef\]](#)
147. Mao, R.; Deng, R.; Wei, Y.; Han, L.; Meng, Y.; Xie, W.; Jia, Z. LIMK1 and LIMK2 Regulate Cortical Development through Affecting Neural Progenitor Cell Proliferation and Migration. *Mol. Brain* **2019**, *12*, 67. [\[CrossRef\]](#)
148. Alzheimer's Association 2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's Dement.* **2016**, *12*, 459–509. [\[CrossRef\]](#)
149. Neugroschl, J.; Wang, S. Alzheimer's Disease: Diagnosis and Treatment Across the Spectrum of Disease Severity: A LIZHEIMER'S DISEASE. *Mt. Sinai. J. Med.* **2011**, *78*, 596–612. [\[CrossRef\]](#)
150. Lyketsos, C.G.; Carrillo, M.C.; Ryan, J.M.; Khachaturian, A.S.; Trzepacz, P.; Amatniek, J.; Cedarbaum, J.; Brashear, R.; Miller, D.S. Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, *7*, 532–539. [\[CrossRef\]](#)
151. Li, X.-L.; Hu, N.; Tan, M.-S.; Yu, J.-T.; Tan, L. Behavioral and Psychological Symptoms in Alzheimer's Disease. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)

152. Wang, J.; Gu, B.J.; Masters, C.L.; Wang, Y.-J. A Systemic View of Alzheimer Disease—Insights from Amyloid- β Metabolism beyond the Brain. *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, *13*, 612–623. [\[CrossRef\]](#)
153. DeTure, M.A.; Dickson, D.W. The Neuropathological Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.* **2019**, *14*, 32. [\[CrossRef\]](#)
154. Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **2020**, *25*, 5789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
155. Heredia, L.; Helguera, P.; de Olmos, S.; Kedikian, G.; Sola Vigo, F.; LaFerla, F.; Staufenbiel, M.; de Olmos, J.; Busciglio, J.; Caceres, A.; et al. Phosphorylation of Actin-Depolymerizing Factor/Cofilin by LIM-Kinase Mediates Amyloid-Induced Degeneration: A Potential Mechanism of Neuronal Dystrophy in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 6533–6542. [\[CrossRef\]](#)
156. Mendoza-Naranjo, A.; Contreras-Vallejos, E.; Henriquez, D.R.; Oth, C.; Bamburg, J.R.; Maccioni, R.B.; Gonzalez-Billault, C. Fibrillar Amyloid- β 1-42 Modifies Actin Organization Affecting the Cofilin Phosphorylation State: A Role for Rac1/Cdc42 Effector Proteins and the Slingshot Phosphatase. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *29*, 63–77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
157. Bamburg, J.R.; Bernstein, B.W. Actin Dynamics and Cofilin-Actin Rods in Alzheimer Disease: Cofilin-Actin Rods in Neuronal Stress. *Cytoskeleton* **2016**, *73*, 477–497. [\[CrossRef\]](#)
158. Maciver, S.K.; Harrington, C.R. Two Actin Binding Proteins, Actin Depolymerizing Factor and Cofilin, Are Associated with Hirano Bodies: 1995, 6, 1985–1988. *NeuroReport* **1995**, *6*, 1985–1988. [\[CrossRef\]](#)
159. Galloway, P.G.; Perry, G.; Gambetti, P. Hirano Body Filaments Contain Actin and Actin-Associated Proteins. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1987**, *46*, 185–199. [\[CrossRef\]](#)
160. Heredia, L.; Lin, R.; Vigo, F.S.; Kedikian, G.; Busciglio, J.; Lorenzo, A. Deposition of Amyloid Fibrils Promotes Cell-Surface Accumulation of Amyloid Beta Precursor Protein. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16*, 617–629. [\[CrossRef\]](#)
161. Rush, T.; Martinez-Hernandez, J.; Dollmeyer, M.; Frandemiche, M.L.; Borel, E.; Boisseau, S.; Jacquier-Sarlin, M.; Buisson, A. Synaptotoxicity in Alzheimer's Disease Involved a Dysregulation of Actin Cytoskeleton Dynamics through Cofilin 1 Phosphorylation. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 10349–10361. [\[CrossRef\]](#)
162. Henderson, B.W.; Gentry, E.G.; Rush, T.; Troncoso, J.C.; Thambisetty, M.; Montine, T.J.; Herskowitz, J.H. Rho-Associated Protein Kinase 1 (ROCK1) Is Increased in Alzheimer's Disease and ROCK1 Depletion Reduces Amyloid- β Levels in Brain. *J. Neurochem.* **2016**, *138*, 525–531. [\[CrossRef\]](#)
163. Henderson, B.W.; Greathouse, K.M.; Ramdas, R.; Walker, C.K.; Rao, T.C.; Bach, S.V.; Curtis, K.A.; Day, J.J.; Mattheyses, A.L.; Herskowitz, J.H. Pharmacologic Inhibition of LIMK1 Provides Dendritic Spine Resilience against β -Amyloid. *Sci. Signal.* **2019**, *12*, eaaw9318. [\[CrossRef\]](#)
164. Zhang, H.; Ben Zablah, Y.; Liu, A.; Lee, D.; Zhang, H.; Meng, Y.; Zhou, C.; Liu, X.; Wang, Y.; Jia, Z. Overexpression of LIMK1 in Hippocampal Excitatory Neurons Improves Synaptic Plasticity and Social Recognition Memory in APP/PS1 Mice. *Mol. Brain* **2021**, *14*, 121. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
165. Cheng, L.; Chen, H.; Li, C.; Xu, C.; Xu, Y.-J. C-Terminal Fragments of Amyloid Precursor Proteins Increase Cofilin Phosphorylation by LIM Kinase in Cultured Rat Primary Neurons. *NeuroReport* **2019**, *30*, 38–45. [\[CrossRef\]](#)
166. Yin, Y.; Zheng, K.; Eid, N.; Howard, S.; Jeong, J.-H.; Yi, F.; Guo, J.; Park, C.M.; Bibian, M.; Wu, W.; et al. Bis-Aryl Urea Derivatives as Potent and Selective LIM Kinase (Limk) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1846–1861. [\[CrossRef\]](#)
167. Moon, M.; Jung, E.S.; Jeon, S.G.; Cha, M.-Y.; Jang, Y.; Kim, W.; Lopes, C.; Mook-Jung, I.; Kim, K.-S. Nurr1 (NR4A2) Regulates Alzheimer's Disease-Related Pathogenesis and Cognitive Function in the 5XFAD Mouse Model: XXXX. *Aging Cell* **2019**, *18*, e12866. [\[CrossRef\]](#)
168. Giasson, B.I.; Lee, V.M.-Y. Parkin and the Molecular Pathways of Parkinson's Disease. *Neuron* **2001**, *31*, 885–888. [\[CrossRef\]](#)
169. Erro, R.; Stamelou, M. The Motor Syndrome of Parkinson's Disease. In *International Review of Neurobiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 132, pp. 25–32. ISBN 978-0-12-809714-4.
170. Forno, L.S. Neuropathology of Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1996**, *55*, 259–272. [\[CrossRef\]](#)
171. Burré, J.; Sharma, M.; Südhof, T.C. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a024091. [\[CrossRef\]](#)
172. Engelender, S. Ubiquitination of α -Synuclein and Autophagy in Parkinson's Disease. *Autophagy* **2008**, *4*, 372–374. [\[CrossRef\]](#)
173. Oliveira da Silva, M.I.; Liz, M.A. Linking Alpha-Synuclein to the Actin Cytoskeleton: Consequences to Neuronal Function. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 787. [\[CrossRef\]](#)
174. Sousa, V.L.; Bellani, S.; Giannandrea, M.; Yousuf, M.; Valtorta, F.; Meldolesi, J.; Chiaregatti, E. α -Synuclein and Its A30P Mutant Affect Actin Cytoskeletal Structure and Dynamics. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3725–3739. [\[CrossRef\]](#)
175. Yan, M.; Meng, L.; Dai, L.; Zhang, X.; Chen, G.; Zheng, Y.; Zha, Y.; Zeng, Y.; Zhang, Z. Cofilin 1 Promotes the Aggregation and Cell-to-Cell Transmission of α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *529*, 1053–1060. [\[CrossRef\]](#)
176. Bellani, S.; Mescola, A.; Ronzitti, G.; Tsushima, H.; Tilve, S.; Canale, C.; Valtorta, F.; Chiaregatti, E. GRP78 Clustering at the Cell Surface of Neurons Transduces the Action of Exogenous Alpha-Synuclein. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1971–1983. [\[CrossRef\]](#)
177. Lim, M.K.; Kawamura, T.; Ohsawa, Y.; Ohtsubo, M.; Asakawa, S.; Takayanagi, A.; Shimizu, N. Parkin Interacts with LIM Kinase 1 and Reduces Its Cofilin-Phosphorylation Activity via Ubiquitination. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 2858–2874. [\[CrossRef\]](#)
178. Chu, Y.; Le, W.; Kompoliti, K.; Jankovic, J.; Mufson, E.J.; Kordower, J.H. Nurr1 in Parkinson's Disease and Related Disorders. *J. Comp. Neurol.* **2006**, *494*, 495–514. [\[CrossRef\]](#)
179. Dong, J.; Li, S.; Mo, J.-L.; Cai, H.-B.; Le, W.-D. Nurr1-Based Therapies for Parkinson's Disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2016**, *22*, 351–359. [\[CrossRef\]](#)

180. Jankovic, J.; Chen, S.; Le, W.D. The Role of Nurr1 in the Development of Dopaminergic Neurons and Parkinson's Disease. *Prog. Neurobiol.* **2005**, *77*, 128–138. [\[CrossRef\]](#)
181. Lord, C.; Elsabbagh, M.; Baird, G.; Veenstra-Vanderweele, J. Autism Spectrum Disorder. *Lancet* **2018**, *392*, 508–520. [\[CrossRef\]](#)
182. Hagerman, R.J.; Berry-Kravis, E.; Hazlett, H.C.; Bailey, D.B.; Moine, H.; Kooy, R.F.; Tassone, F.; Gantois, I.; Sonenberg, N.; Mandel, J.L.; et al. Fragile X Syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17065. [\[CrossRef\]](#)
183. Maurin, T.; Zongaro, S.; Bardoni, B. Fragile X Syndrome: From Molecular Pathology to Therapy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2014**, *46*, 242–255. [\[CrossRef\]](#)
184. Chidambaram, S.B.; Rathipriya, A.G.; Bolla, S.R.; Bhat, A.; Ray, B.; Mahalakshmi, A.M.; Manivasagam, T.; Thenmozhi, A.J.; Essa, M.M.; Guillemin, G.J.; et al. Dendritic Spines: Revisiting the Physiological Role. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2019**, *92*, 161–193. [\[CrossRef\]](#)
185. Nishiyama, J. Plasticity of Dendritic Spines: Molecular Function and Dysfunction in Neurodevelopmental Disorders. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **2019**, *73*, 541–550. [\[CrossRef\]](#)
186. Michaelsen-Preusse, K.; Feuge, J.; Korte, M. Imbalance of Synaptic Actin Dynamics as a Key to Fragile X Syndrome?: Synaptic Actin and Fragile X Syndrome. *J. Physiol.* **2018**, *596*, 2773–2782. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
187. Tian, C.; Kay, Y.; Sadybekov, A.; Rao, S.; Katritch, V.; Herring, B.E. An Intellectual Disability-Related Missense Mutation in Rac1 Prevents LTP Induction. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 223. [\[CrossRef\]](#)
188. Fatemi, S.; Folsom, T.D.; Kneeland, R.E.; Yousefi, M.K.; Liesch, S.B.; Thuras, P.D. Impairment of Fragile X Mental Retardation Protein-Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling and Its Downstream Cognates Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1, Amyloid Beta A4 Precursor Protein, Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase, and Homer 1, in Autism: A Postmortem Study in Cerebellar Vermis and Superior Frontal Cortex. *Mol. Autism.* **2013**, *4*, 21. [\[CrossRef\]](#)
189. Pyronneau, A.; He, Q.; Hwang, J.-Y.; Porch, M.; Contractor, A.; Zukin, R.S. Aberrant Rac1-Cofilin Signaling Mediates Defects in Dendritic Spines, Synaptic Function, and Sensory Perception in Fragile X Syndrome. *Sci. Signal.* **2017**, *10*, eaan0852. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
190. Dolan, B.M.; Duron, S.G.; Campbell, D.A.; Vollrath, B.; Rao, B.S.S.; Ko, H.-Y.; Lin, G.G.; Govindarajan, A.; Choi, S.-Y.; Tonegawa, S. Rescue of Fragile X Syndrome Phenotypes in Fmr1 KO Mice by the Small-Molecule PAK Inhibitor FRAX486. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5671–5676. [\[CrossRef\]](#)
191. Hayashi, M.L.; Rao, B.S.S.; Seo, J.-S.; Choi, H.-S.; Dolan, B.M.; Choi, S.-Y.; Chattarji, S.; Tonegawa, S. Inhibition of P21-Activated Kinase Rescues Symptoms of Fragile X Syndrome in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11489–11494. [\[CrossRef\]](#)
192. Kashima, R.; Roy, S.; Ascano, M.; Martinez-Cerdeno, V.; Ariza-Torres, J.; Kim, S.; Louie, J.; Lu, Y.; Leyton, P.; Bloch, K.D.; et al. Augmented Noncanonical BMP Type II Receptor Signaling Mediates the Synaptic Abnormality of Fragile X Syndrome. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, ra58. [\[CrossRef\]](#)
193. Lee-Hoeflich, S.T.; Causing, C.G.; Podkowa, M.; Zhao, X.; Wrana, J.L.; Attisano, L. Activation of LIMK1 by Binding to the BMP Receptor, BMPRII, Regulates BMP-Dependent Dendritogenesis. *EMBO J.* **2004**, *23*, 4792–4801. [\[CrossRef\]](#)
194. Kashima, R.; Redmond, P.L.; Ghatpande, P.; Roy, S.; Komberg, T.B.; Hanke, T.; Knapp, S.; Lagna, G.; Hata, A. Hyperactive Locomotion in a *Drosophila* Model Is a Functional Readout for the Synaptic Abnormalities Underlying Fragile X Syndrome. *Sci. Signal.* **2017**, *10*, eaai8133. [\[CrossRef\]](#)
195. Yao, F.; Zhang, K.; Feng, C.; Gao, Y.; Shen, L.; Liu, X.; Ni, J. Protein Biomarkers of Autism Spectrum Disorder Identified by Computational and Experimental Methods. *Front. Psychiatry* **2021**, *12*, 93. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
196. Owen, M.J.; Sawa, A.; Mortensen, P.B. Schizophrenia. *Lancet* **2016**, *388*, 86–97. [\[CrossRef\]](#)
197. Fromer, M.; Pocklington, A.J.; Kavanagh, D.H.; Williams, H.J.; Dwyer, S.; Gormley, P.; Georgieva, L.; Rees, E.; Palta, P.; Ruderfer, D.M.; et al. De Novo Mutations in Schizophrenia Implicate Synaptic Networks. *Nature* **2014**, *506*, 179–184. [\[CrossRef\]](#)
198. Hall, J.; Trent, S.; Thomas, K.L.; O'Donovan, M.C.; Owen, M.J. Genetic Risk for Schizophrenia: Convergence on Synaptic Pathways Involved in Plasticity. *Biol. Psychiatry* **2015**, *77*, 52–58. [\[CrossRef\]](#)
199. Hill, J.J.; Hashimoto, T.; Lewis, D.A. Molecular Mechanisms Contributing to Dendritic Spine Alterations in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **2006**, *11*, 557–566. [\[CrossRef\]](#)
200. Ide, M.; Lewis, D.A. Altered Cortical CDC42 Signaling Pathways in Schizophrenia: Implications for Dendritic Spine Deficits. *Biol. Psychiatry* **2010**, *68*, 25–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
201. Datta, D.; Arion, D.; Corradi, J.P.; Lewis, D.A. Altered Expression of CDC42 Signaling Pathway Components in Cortical Layer 3 Pyramidal Cells in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 775–785. [\[CrossRef\]](#)
202. Genis-Mendoza, A.D.; Beltrán-Villalobos, I.; Nicolini-Sánchez, H. Behavioral Assessment of the “Schizophrenia-like” Phenotype in an Animal Model of Neonatal Lesion in the Ventral Hippocampus (NLVH) of Young and Adult Rats. *Gac. Med. Mex.* **2014**, *150*, 420–431.
203. Genis-Mendoza, A.D.; Gallegos-Silva, R.I.; López-Casamichana, M.; López-Rubalcava, C.; Nicolini, H. Gene Expression Profiles of Nucleus Accumbens, Prefrontal Cortex and Hippocampus in an Animal Model of Schizophrenia: Proposed Candidate Genes. *Actas. Esp. Psiquiatr.* **2013**, *41*, 154–163.
204. Foote, M.; Qiao, H.; Graham, K.; Wu, Y.; Zhou, Y. Inhibition of 14-3-3 Proteins Leads to Schizophrenia-Related Behavioral Phenotypes and Synaptic Defects in Mice. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 386–395. [\[CrossRef\]](#)

205. Zhao, Z.; Xu, J.; Chen, J.; Kim, S.; Reimers, M.; Bacanu, S.-A.; Yu, H.; Liu, C.; Sun, J.; Wang, Q.; et al. Transcriptome Sequencing and Genome-Wide Association Analyses Reveal Lysosomal Function and Actin Cytoskeleton Remodeling in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Mol. Psychiatry* **2015**, *20*, 563–572. [\[CrossRef\]](#)
206. Liu, A.; Zhou, Z.; Dang, R.; Zhu, Y.; Qi, J.; He, G.; Leung, C.; Pak, D.; Jia, Z.; Xie, W. Neuroligin 1 Regulates Spines and Synaptic Plasticity via LIMK1/Cofilin-Mediated Actin Reorganization. *J. Cell Biol.* **2016**, *212*, 449–463. [\[CrossRef\]](#)
207. Stefansson, H.; Petursson, H.; Sigurdsson, E.; Steinthorsdottir, V.; Bjornsdottir, S.; Sigmundsson, T.; Ghosh, S.; Brynjolfsson, J.; Gunnarsdottir, S.; Ivarsson, O.; et al. Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *71*, 877–892. [\[CrossRef\]](#)
208. Chen, P.; Jing, H.; Xiong, M.; Zhang, Q.; Lin, D.; Ren, D.; Wang, S.; Yin, D.; Chen, Y.; Zhou, T.; et al. Spine Impairment in Mice High-Expressing Neuregulin 1 Due to LIMK1 Activation. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 403. [\[CrossRef\]](#)
209. Yin, D.-M.; Chen, Y.-J.; Lu, Y.-S.; Bean, J.C.; Sathyamurthy, A.; Shen, C.; Liu, X.; Lin, T.W.; Smith, C.A.; Xiong, W.-C.; et al. Reversal of Behavioral Deficits and Synaptic Dysfunction in Mice Overexpressing Neuregulin 1. *Neuron* **2013**, *78*, 644–657. [\[CrossRef\]](#)
210. Gory-Fauré, S.; Powell, R.; Jonckheere, J.; Lanté, F.; Denarier, E.; Peris, L.; Nguyen, C.H.; Buisson, A.; Lafanechère, L.; Andrieux, A. Pyr1-Mediated Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Restores Synaptic Plasticity and Normal Behavior in a Mouse Model of Schizophrenia. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 627995. [\[CrossRef\]](#)
211. Kozel, B.A.; Barak, B.; Kim, C.A.; Mervis, C.B.; Osborne, L.R.; Porter, M.; Pober, B.R. Williams Syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2021**, *7*, 42. [\[CrossRef\]](#)
212. Gregory, M.D.; Mervis, C.B.; Elliott, M.L.; Kippenhan, J.S.; Nash, T.; Czarapata, J.B.; Prabhakaran, R.; Roe, K.; Eisenberg, D.P.; Kohn, P.D.; et al. Williams Syndrome Hemideletion and LIMK1 Variation Both Affect Dorsal Stream Functional Connectivity. *Brain* **2019**, *142*, 3963–3974. [\[CrossRef\]](#)
213. Frangiskakis, J.M.; Ewart, A.K.; Morris, C.A.; Mervis, C.B.; Bertrand, J.; Robinson, B.F.; Klein, B.P.; Ensing, G.J.; Everett, L.A.; Green, E.D.; et al. LIM-Kinase1 Hemizygosity Implicated in Impaired Visuospatial Constructive Cognition. *Cell* **1996**, *86*, 59–69. [\[CrossRef\]](#)
214. Brown, R.H.; Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 162–172. [\[CrossRef\]](#)
215. Sivadasan, R.; Hornburg, D.; Drepper, C.; Frank, N.; Jablonka, S.; Hansel, A.; Lojewski, X.; Sterneckert, J.; Hermann, A.; Shaw, P.J.; et al. C9ORF72 Interaction with Cofilin Modulates Actin Dynamics in Motor Neurons. *Nat. Neurosci.* **2016**, *19*, 1610–1618. [\[CrossRef\]](#)
216. Hensel, N.; Claus, P. The Actin Cytoskeleton in SMA and ALS: How Does It Contribute to Motoneuron Degeneration? *Neuroscientist* **2018**, *24*, 54–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
217. Russo, K.; Wharton, K.A. BMP/TGF- β Signaling as a Modulator of Neurodegeneration in ALS. *Dev. Dyn.* **2021**, *251*, 10–25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
218. Shah, K.; Rossie, S. Tale of the Good and the Bad Cdk5: Remodeling of the Actin Cytoskeleton in the Brain. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 3426–3438. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
219. Gillardon, F.; Steinlein, P.; Bürger, E.; Hildebrandt, T.; Gerner, C. Phosphoproteome and Transcriptome Analysis of the Neuronal Response to a CDK5 Inhibitor. *Proteomics* **2005**, *5*, 1299–1307. [\[CrossRef\]](#)
220. Conti, A.; Riva, N.; Pesca, M.; Iannaccone, S.; Cannistraci, C.V.; Corbo, M.; Previtali, S.C.; Quattrini, A.; Alessio, M. Increased Expression of Myosin Binding Protein H in the Skeletal Muscle of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 99–106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
221. Cimino, P.J.; Gutmann, D.H. Neurofibromatosis Type 1. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 148, pp. 799–811. ISBN 978-0-444-64076-5.
222. Hyman, S.L.; Shores, A.; North, K.N. The Nature and Frequency of Cognitive Deficits in Children with Neurofibromatosis Type 1. *Neurology* **2005**, *65*, 1037–1044. [\[CrossRef\]](#)
223. Viskochil, D.; Buchberg, A.M.; Xu, G.; Cawthon, R.M.; Stevens, J.; Wolff, R.K.; Culver, M.; Carey, J.C.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; et al. Deletions and a Translocation Interrupt a Cloned Gene at the Neurofibromatosis Type 1 Locus. *Cell* **1990**, *62*, 187–192. [\[CrossRef\]](#)
224. Daston, M.M.; Scrabble, H.; Nordlund, M.; Sturbaum, A.K.; Nissen, L.M.; Ratner, N. The Protein Product of the Neurofibromatosis Type 1 Gene Is Expressed at Highest Abundance in Neurons, Schwann Cells, and Oligodendrocytes. *Neuron* **1992**, *8*, 415–428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
225. Bergoug, M.; Doudeau, M.; Godin, E.; Mosrin, C.; Vallée, B.; Bénédicti, H. Neurofibromin Structure, Functions and Regulation. *Cells* **2020**, *9*, 2365. [\[CrossRef\]](#)
226. Ozawa, T.; Araki, N.; Yunoue, S.; Tokuo, H.; Feng, L.; Patrakitkomjorn, S.; Hara, T.; Ichikawa, Y.; Matsumoto, K.; Fujii, K.; et al. The Neurofibromatosis Type 1 Gene Product Neurofibromin Enhances Cell Motility by Regulating Actin Filament Dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-Cofilin Pathway. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39524–39533. [\[CrossRef\]](#)
227. Asthagiri, A.R.; Parry, D.M.; Butman, J.A.; Kim, H.J.; Tsilou, E.T.; Zhuang, Z.; Lonser, R.R. Neurofibromatosis Type 2. *Lancet* **2009**, *373*, 1974–1986. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
228. Cooper, J.; Giancotti, F.G. Molecular Insights into NF2 /Merlin Tumor Suppressor Function. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 2743–2752. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
229. Mota, M.; Shevde, L.A. Merlin Regulates Signaling Events at the Nexus of Development and Cancer. *Cell Commun. Signal* **2020**, *18*, 63. [\[CrossRef\]](#)

230. Kissil, J.L.; Wilker, E.W.; Johnson, K.C.; Eckman, M.S.; Yaffe, M.B.; Jacks, T. Merlin, the Product of the Nf2 Tumor Suppressor Gene, Is an Inhibitor of the P21-Activated Kinase, Pak1. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 841–849. [\[CrossRef\]](#)
231. Petrilli, A.; Copik, A.; Posadas, M.; Chang, L.-S.; Welling, D.B.; Giovannini, M.; Fernández-Valle, C. LIM Domain Kinases as Potential Therapeutic Targets for Neurofibromatosis Type 2. *Oncogene* **2014**, *33*, 3571–3582. [\[CrossRef\]](#)
232. Taylor, M.P.; Koyuncu, O.O.; Enquist, L.W. Subversion of the Actin Cytoskeleton during Viral Infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 427–439. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
233. Walsh, D.; Naghavi, M.H. Exploitation of Cytoskeletal Networks during Early Viral Infection. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 39–50. [\[CrossRef\]](#)
234. Manetti, F. HIV-1 Proteins Join the Family of LIM Kinase Partners. New Roads Open up for HIV-1 Treatment. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 81–88. [\[CrossRef\]](#)
235. Ospina Stella, A.; Turville, S. All-Round Manipulation of the Actin Cytoskeleton by HIV. *Viruses* **2018**, *10*, 63. [\[CrossRef\]](#)
236. Stolp, B.; Fackler, O.T. How HIV Takes Advantage of the Cytoskeleton in Entry and Replication. *Viruses* **2011**, *3*, 293–311. [\[CrossRef\]](#)
237. Vorster, P.J.; Guo, J.; Yoder, A.; Wang, W.; Zheng, Y.; Xu, X.; Yu, D.; Spear, M.; Wu, Y. LIM Kinase 1 Modulates Cortical Actin and CXCR4 Cycling and Is Activated by HIV-1 to Initiate Viral Infection. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 12554–12564. [\[CrossRef\]](#)
238. Yoder, A.; Yu, D.; Dong, L.; Iyer, S.R.; Xu, X.; Kelly, J.; Liu, J.; Wang, W.; Vorster, P.J.; Agulto, L.; et al. HIV Envelope-CXCR4 Signaling Activates Cofilin to Overcome Cortical Actin Restriction in Resting CD4 T Cells. *Cell* **2008**, *134*, 782–792. [\[CrossRef\]](#)
239. Cameron, P.U.; Saleh, S.; Sallmann, G.; Solomon, A.; Wightman, F.; Evans, V.A.; Boucher, G.; Haddad, E.K.; Sekaly, R.-P.; Harman, A.N.; et al. Establishment of HIV-1 Latency in Resting CD4+ T Cells Depends on Chemokine-Induced Changes in the Actin Cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16934–16939. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
240. Wu, Y.; Yoder, A.; Yu, D.; Wang, W.; Liu, J.; Barrett, T.; Wheeler, D.; Schlauch, K. Cofilin Activation in Peripheral CD4 T Cells of HIV-1 Infected Patients: A Pilot Study. *Retrovirology* **2008**, *5*, 95. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
241. Ishaq, M.; Lin, B.-R.; Bosche, M.; Zheng, X.; Yang, J.; Huang, D.; Lempicki, R.A.; Natarajan, V. LIM Kinase 1-Dependent Cofilin 1 Pathway and Actin Dynamics Mediate Nuclear Retinoid Receptor Function in T Lymphocytes. *BMC Mol. Biol.* **2011**, *12*, 41. [\[CrossRef\]](#)
242. Gladnikoff, M.; Shimoni, E.; Gov, N.S.; Rousso, I. Retroviral Assembly and Budding Occur through an Actin-Driven Mechanism. *Biophys. J.* **2009**, *97*, 2419–2428. [\[CrossRef\]](#)
243. Wen, X.; Ding, L.; Wang, J.-J.; Qi, M.; Hammonds, J.; Chu, H.; Chen, X.; Hunter, E.; Spearman, P. ROCK1 and LIM Kinase Modulate Retrovirus Particle Release and Cell-Cell Transmission Events. *J. Virol.* **2014**, *88*, 6906–6921. [\[CrossRef\]](#)
244. Van den Broeke, C.; Favoreel, H.W. Actin' up: Herpesvirus Interactions with Rho GTPase Signaling. *Viruses* **2011**, *3*, 278–292. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
245. Xiang, Y.; Zheng, K.; Ju, H.; Wang, S.; Pei, Y.; Ding, W.; Chen, Z.; Wang, Q.; Qiu, X.; Zhong, M.; et al. Cofilin 1-Mediated Biphasic F-Actin Dynamics of Neuronal Cells Affect Herpes Simplex Virus 1 Infection and Replication. *J. Virol.* **2012**, *86*, 8440–8451. [\[CrossRef\]](#)
246. Zheng, K.; Xiang, Y.; Wang, X.; Wang, Q.; Zhong, M.; Wang, S.; Wang, X.; Fan, J.; Kitazato, K.; Wang, Y. Epidermal Growth Factor Receptor-PI3K Signaling Controls Cofilin Activity To Facilitate Herpes Simplex Virus 1 Entry into Neuronal Cells. *mBio* **2014**, *5*, e00958-13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
247. Li, F.; Song, X.; Su, G.; Wang, Y.; Wang, Z.; Jia, J.; Qing, S.; Huang, L.; Wang, Y.; Zheng, K.; et al. Amentoflavone Inhibits HSV-1 and ACV-Resistant Strain Infection by Suppressing Viral Early Infection. *Viruses* **2019**, *11*, 466. [\[CrossRef\]](#)
248. Yi, F.; Guo, J.; Dabbagh, D.; Spear, M.; He, S.; Kehn-Hall, K.; Fontenot, J.; Yin, Y.; Bibian, M.; Park, C.M.; et al. Discovery of Novel Small-Molecule Inhibitors of LIM Domain Kinase for Inhibiting HIV-1. *J. Virol.* **2017**, *91*, 21. [\[CrossRef\]](#)
249. Wang, Y.; Song, X.; Wang, Y.; Huang, L.; Luo, W.; Li, F.; Qin, S.; Wang, Y.; Xiao, J.; Wu, Y.; et al. Dysregulation of Cofilin-1 Activity—the Missing Link between Herpes Simplex Virus Type-1 Infection and Alzheimer's Disease. *Crit. Rev. Microbiol.* **2020**, *46*, 381–396. [\[CrossRef\]](#)
250. Park, J.; Kim, S.W.; Cho, M.C. The Role of LIM Kinase in the Male Urogenital System. *Cells* **2021**, *11*, 78. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

II. Les stapled peptides, une nouvelle stratégie d'inhibition des LIM kinases

II.1. Les LIM kinases, des cibles thérapeutiques d'intérêt : développement d'inhibiteurs petites molécules ciblant leur site actif

Les LIM kinases ont été décrites dans la littérature comme des cibles thérapeutiques prometteuses. Ce sont des kinases atypiques, à activité sérine/thréonine et tyrosine kinase, et situées très en aval de leurs voies de signalisation. Impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques de par leur rôle dans le remaniement du cytosquelette [1], elles offrent un espoir pour le traitement de pathologies pour lesquelles il n'existe aujourd'hui aucune solution thérapeutique, mais également une alternative aux thérapies existantes, en oncologie notamment, comme les thérapies à base de taxanes qui engendrent de nombreux effets secondaires et des résistances [2–5]. Depuis 2008, de nombreuses petites molécules chimiques ont été développées dans le but d'inhiber l'activité kinase des LIMKs dont certaines ont obtenu des résultats intéressants in vitro et in vivo sur des modèles murins de différentes pathologies. L'une d'elle, le LX7101, a même atteint le stade des essais cliniques. Berabez et al. (2022), dans leur revue intitulée *LIM Kinases, Promising but Reluctant Therapeutic Targets: Chemistry and Preclinical Validation In Vivo*, font état de l'avancée dans le design de molécules inhibitrices ciblant les LIMKs et leur efficacité en pré-clinique [6].

Historiquement, les premières molécules chimiques inhibitrices des LIMKs ont été mises au point par Bristol-Myers Squibb (BMS) en 2006 parmi un panel de 300 molécules ciblant les LIMKs ou p38 [7]. Six de ces molécules ont été testées d'une part pour leur cytotoxicité sur une lignée cellulaire de cancer du poumon et d'autre part pour leur capacité à inhiber LIMK1 et LIMK2. Ces inhibiteurs ont été classés en trois catégories : « dual » (cytotoxiques et inhibiteurs), « LIMKi » (non-cytotoxiques et inhibiteurs) et « cytotoxic » (cytotoxiques et non-inhibiteurs). La cytotoxicité des inhibiteurs « cytotoxic » et « dual » a pu être expliquée notamment par leur capacité à dépolymériser les microtubules in vitro. Deux molécules classées « LIMKi », LIMKi3/BMS5 et LIMKi4/BMS, se sont avérées capables d'inhiber la phosphorylation de la cofiline, sans cytotoxicité apparente [8]. Le composé 2/BMS3 (initialement classé comme « dual ») a été testé ultérieurement in vivo

chez des souris xénogreffées avec des tumeurs mammaires. En dépit de résultats *in vitro* prometteurs, où le composé a permis de diminuer le potentiel invasif de cellules tumorales mammaires murines et humaines en culture, BMS3 n'a pas permis d'inhiber la croissance tumorale chez les souris greffées et a même favorisé la dissémination de la tumeur primaire et la formation de métastases dans le foie [9]. LIMKi3/BMS5 a également fait l'objet de deux essais *in vivo*. L'un de ces essais portait sur l'implication de LIMK, de la cofiline et plus généralement du remodelage de l'actine dans le traitement mémoriel de la peur. Medina et al. (2020) ont mis en évidence que l'inhibition de LIMK entraînait un déficit dans la consolidation de la mémoire lors des réponses à la peur, de façon dose-dépendante et avec des effets sur le long terme [10]. Yang et al. (2017) ont quant à eux mis en évidence que les LIMKs jouaient un rôle dans le développement de multiples formes de douleurs chroniques. En l'absence de LIMK, chez des souris KO ou lorsque les protéines sont inhibées de façon pharmacologique, le développement de douleurs chroniques est largement diminué. Ceci a ouvert la voie à l'utilisation potentielle de BMS5 pour le traitement des douleurs chroniques, notamment chez les patients souffrant d'inflammations chroniques, de lésions nerveuses ou en post-opératoire [11].

En 2009, Lexicon Pharmaceuticals a développé une série d'inhibiteurs ciblant la dynamique du cytosquelette dans l'objectif de développer un traitement contre le glaucome à angle ouvert. Ils ont mis en évidence une nouvelle famille d'inhibiteurs de LIMK diminuant la pression intraoculaire, un facteur de risque du glaucome. Trois de ces composés (15, 19 et 20) ont été testés par instillation topique sur des modèles de souris avec hypertension oculaire induite par la dexaméthasone. Ils ont conduit à la diminution de la pression intraoculaire. Ultérieurement, les composés 15 et 20 ont été testés lors d'une expérience de perfusion oculaire, avec des résultats prometteurs [12]. Le composé 20 a servi de base à l'élaboration d'un nouvel inhibiteur qui a lui-même fait l'objet d'une étude *in vivo* en 2015 sous le nom de LX7101, un inhibiteur dual ciblant LIMK1/2 et ROCK2. Sa tolérance a été évaluée sur souris, rats et lapins, avec une dose fixée à 0,5%. Le composé a ensuite été comparé aux traitements classiques contre le glaucome (Timolol et Latanoprost) aux doses commerciales, ce qui a permis de mettre en évidence l'efficacité du composé sur la diminution de la pression intraoculaire [13]. En parallèle de cette publication, une étude clinique (phases 1/2a) a également été menée sur ce composé dans le cadre du traitement contre le glaucome, sans résultats publiés à ce jour [14]. LX7101 a été testé sur des lignées cancéreuses de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231 et BT-549) et sur des souris

xénogreffées dans le cadre d'une étude sur l'implication de LIMK2 dans la progression métastatique du cancer du sein triple négatif. En dépit de résultats prometteurs *in vitro* (diminution de la phosphorylation de la cofiline, migration cellulaire et invasivité réduites, diminution de la dégradation de la matrice extracellulaire), aucun effet sur la taille de la tumeur primaire n'a été observé, même si une diminution du potentiel métastatique de la tumeur a été constaté [15].

Synthétisé en 1983 par Rivalle et al. [16] et mis en évidence en 2012 par l'équipe de Laurence Lafanechère lors d'un screening visant à mettre en évidence des composés perturbant la régulation des microtubules, Pyr1 est une molécule hautement sélective pour LIMK1 et LIMK2, qui agit comme un compétiteur de l'ATP [17]. Sur cellules HeLa, le composé a des effets sur le cytosquelette en déstabilisant les filaments d'actine d'une part et en stabilisant les microtubules d'autre part. Pyr1 a montré une bonne activité anti-cancéreuse *in vitro* sur des lignées cellulaires HEK-293, ABCG2 et BHK-21-MRP1, résistantes aux thérapies classiques ciblant les microtubules. *In vivo*, le composé a été testé sur une lignée de souris modèle de leucémie avec un gain de survie total [17]. Pyr1 a également été testé sur des lignées de cancer du sein (TS-A-pGL3 et MDA-MB-231), où il a été montré que son administration entraînait une inhibition de la phosphorylation de la cofiline, affectait le remodelage du cytosquelette, ce qui avait pour conséquence une diminution de la motilité cellulaire et de l'invasivité [18]. Des tests *in vivo* ont également été réalisés sur des lignées de souris xénogreffées avec des cellules de cancer du sein. Sur ces modèles, le composé a permis d'arrêter la croissance tumorale et d'empêcher la croissance des métastases, mais pas leur migration. Par ailleurs, les auteurs ont relevé une corrélation entre le changement de morphologie des cellules traitées par Pyr1, plus rondes, et leur capacité à migrer plus loin que les autres populations cellulaires [18]. Enfin, il existe un lien étroit entre la dérégulation du cytosquelette, les anomalies de la morphologie des épines dendritiques et le développement de désordres neurologiques, notamment la schizophrénie. L'efficacité de Pyr1 a donc été testée au cours d'une étude sur un modèle murin de schizophrénie, où il a été montré que le composé permettait une restauration de la densité des épines dendritiques et une amélioration de la potentialisation à long terme. Les souris présentaient par ailleurs une meilleure plasticité synaptique et des comportements liés à la dépression et à l'anxiété réduits. Pyr1 représente, de fait, une bonne opportunité thérapeutique pour le traitement de ces pathologies [19].

En 2012, Mashiach-Farkash et al. mettent en évidence une identité de séquence de 31% entre LIMK2 et le récepteur à activité tyrosine kinase EphA3, une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement contre le cancer [20]. Une analyse structurale de EphA3 menée au préalable a permis d'émettre l'hypothèse que l'inhibiteur AWL-II-38.3, capable de bloquer le site actif de la protéine, était également capable de bloquer celui de LIMK2, structuralement très proche [21]. T56-LIMKi est un composé vraisemblablement élaboré à partir de AWL-II-38.3. Cette molécule a été testée sur une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris où le gène *NF1* codant pour la Neurofibromine 1 (Nf1) a été invalidé. Chez ces souris, les taux de cofiline phosphorylée sont naturellement plus élevés que chez les sauvages [22]. Le traitement par T56-LIMKi a permis de diminuer le taux de cofilin phosphorylée, mais également de limiter la formation des fibres de stress et d'inhiber la migration cellulaire [20]. D'autres tests menés par la même équipe deux ans plus tard ont permis de mettre en évidence que la molécule était sélective de LIMK2, et qu'elle inhibe la prolifération cellulaire de certaines lignées de cellules cancéreuses de façon spécifique (les lignées U87 (glioblastome), ST88-14 (schwannome) et Panc-1 (pancréas) étant celles qui répondaient le mieux). Un essai in vivo a été mené suite aux résultats sur les cellules Panc-1. Il est apparu que T56-LIMKi permettait une diminution de la tumeur primaire de façon temps- et dose-dépendante avec une disparition totale au bout de 35 jours. Par ailleurs, l'analyse moléculaire des tissus tumoraux a permis de mettre en évidence une importante diminution des niveaux de cofiline phosphorylée [23]. Enfin, une étude récente a été menée sur les possibles effets neuroprotecteurs de T56-LIMKi. La molécule a été administrée à des souris irradiées par traitement laser dans le but de mimer les effets d'un choc ischémique sur le cortex cérébral. Dans le cas d'un accident vasculaire cérébral ischémique, on observe une augmentation locale de la concentration de près de 80 protéines, dont la cofiline. Les auteurs ont mis en évidence que T56-LIMKi entraînait une diminution du volume de l'infarctus, permettait une restauration de la morphologie cérébrale et une réduction du nombre de cellules altérées. Ces résultats très prometteurs ont ouvert la voie à l'utilisation d'inhibiteurs anti-LIMK2 comme agents neuro-protecteurs dans le cadre de thérapies anti-ischémiques [24].

Les structures chimiques des différents inhibiteurs précédemment décrits sont représentées **Figure 1**.

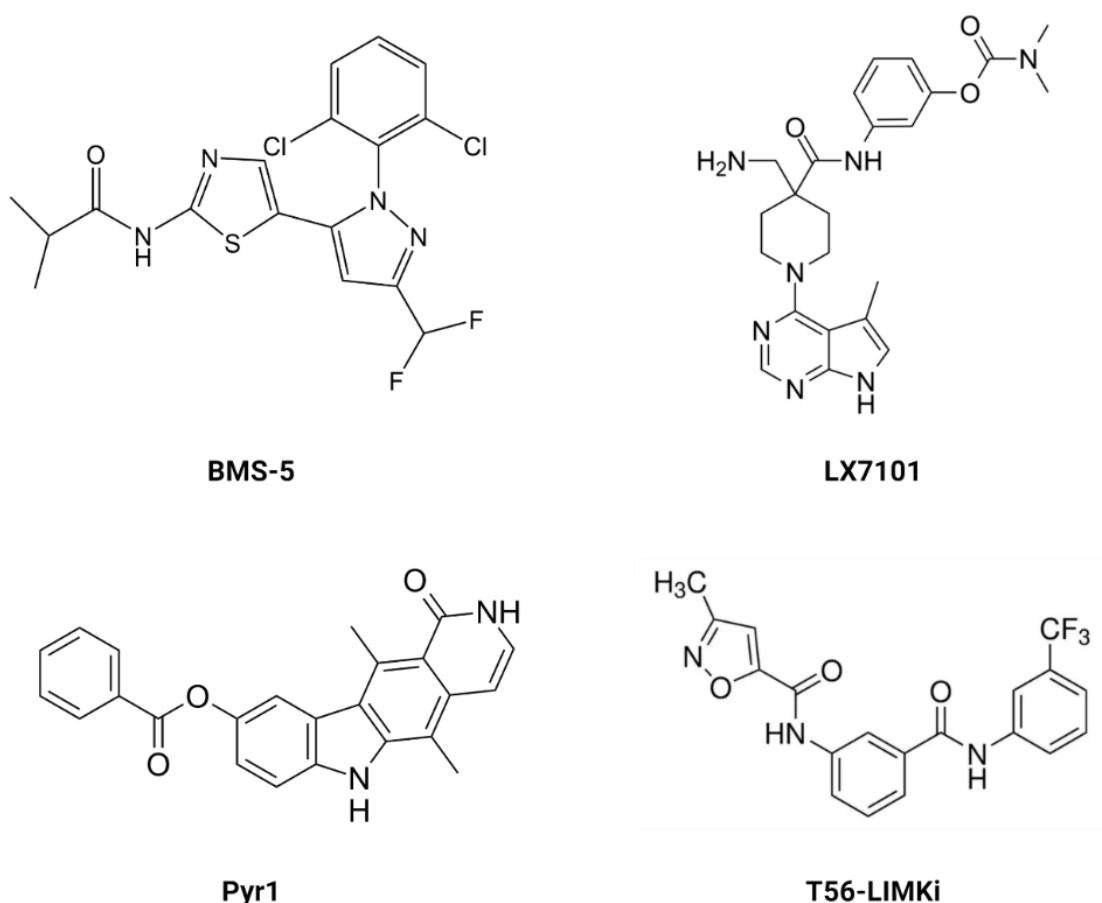


Figure 1 : Structure des principales molécules développées pour inhiber l'activité des LIM kinases.
 BMS-5, développée en 2006 par Bristol-Meyers Squibb, LX7101, développée en 2015 par Lexicon Pharmaceuticals, Pyr1, développée en 1983 et mise en évidence en 2012 par Lafanechère et collaborateurs, et T56-LIMKi, développée en 2012 par Kloog et collaborateurs.

De nombreux autres inhibiteurs ciblant les LIMKs ont vu le jour ces dix dernières années (le composé CEL-Amide pour le traitement de la leucémie, le Damnacanthal, une molécule isolée depuis les racines de *Morinda citrifolia*, TH-257...), avec des résultats in vitro parfois très prometteurs [25–28]. Pourtant, aucun de ces composés n'est parvenu au stade des essais cliniques. Aussi, pour qu'une thérapie ciblant les LIMKs voie le jour, le développement de nouvelles stratégies d'inhibition est aujourd'hui nécessaire. Au cours du chapitre précédent, nous avons évoqué l'importance des interactions protéine-protéine et le rôle qu'elles jouent dans le fonctionnement normal de la cellule, ainsi que dans le développement des pathologies. Cibler l'interaction entre les LIMKs et la cofiline, leur substrat canonique, semble être une opportunité thérapeutique particulièrement novatrice et sélective, qui permettrait de cibler spécifiquement le remodelage des filaments d'actine sans affecter l'activité des LIMKs sur leurs nombreux autres partenaires. Cette stratégie est d'autant plus pertinente que l'interaction entre les LIMKs et la cofiline est parfaitement bien

caractérisée par la résolution de la structure 3D de ce complexe par cristallographie aux rayons X qui révèle une réelle possibilité d'abolir cette interaction.

II.2. Une interaction atypique entre les LIMKs et cofiline

Canoniquement, la reconnaissance entre une kinase et son substrat se fait à plusieurs niveaux. En premier lieu, la structure du site actif va déterminer la spécificité de la protéine kinase. De manière générale, les tyrosine kinases présentent un site actif plus profond que les serine/thréonine kinases. Les résidus tyrosine, grâce à la longueur de leur chaîne latérale, vont pouvoir enfouir le groupement phosphoaccepteur dans le site actif, ce qui est impossible pour les résidus serine et thréonine dont les chaînes latérales sont plus courtes (**Figure 2**). Il existe toutefois des protéines kinases, telles que les LIM kinases, capables de phosphoryler à la fois les résidus serine/thréonine et tyrosine [29,30].

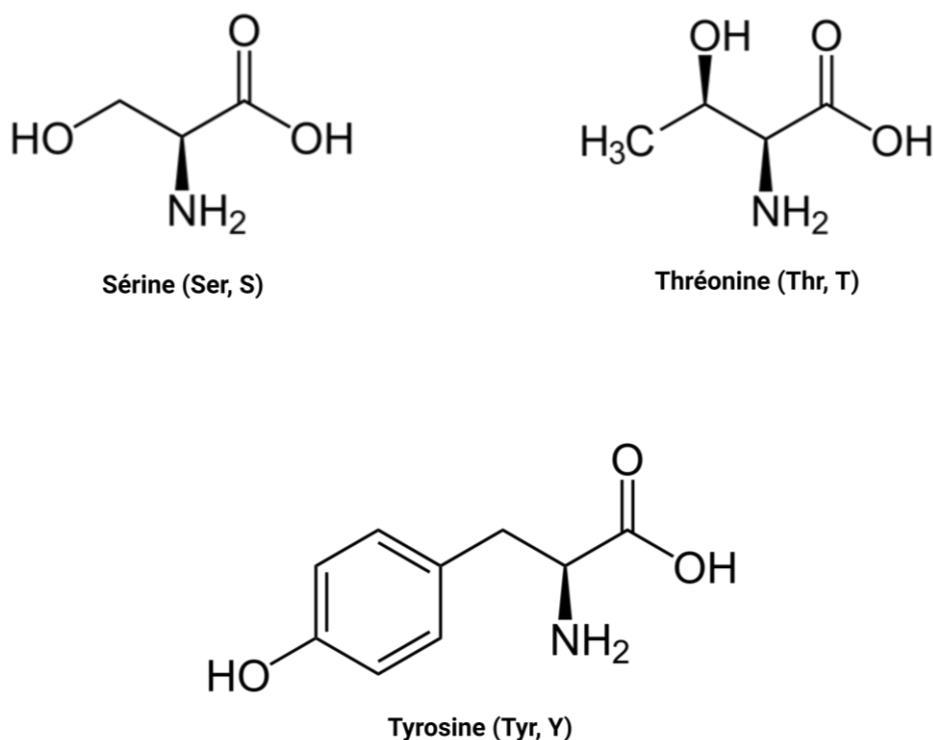


Figure 2 : Structure des résidus sérine, thréonine, tyrosine.

Les phosphorylations ont lieu sur les chaînes latérales des acides aminés comportant une fonction alcool (C-OH). Parmi les 22 acides aminés, seuls 3 peuvent être phosphorylés : la sérine (Ser, S), la thréonine (Thr, T) et la tyrosine (Tyr, Y).

Outre la structure de la poche catalytique, la reconnaissance kinase-substrat peut se faire de deux manières différentes : les séquences consensus (motif linéaire) et le docking à distance (*distal docking*). Ces deux mécanismes de reconnaissance peuvent être complémentaires l'un de l'autre comme présenté **Figure 3**.

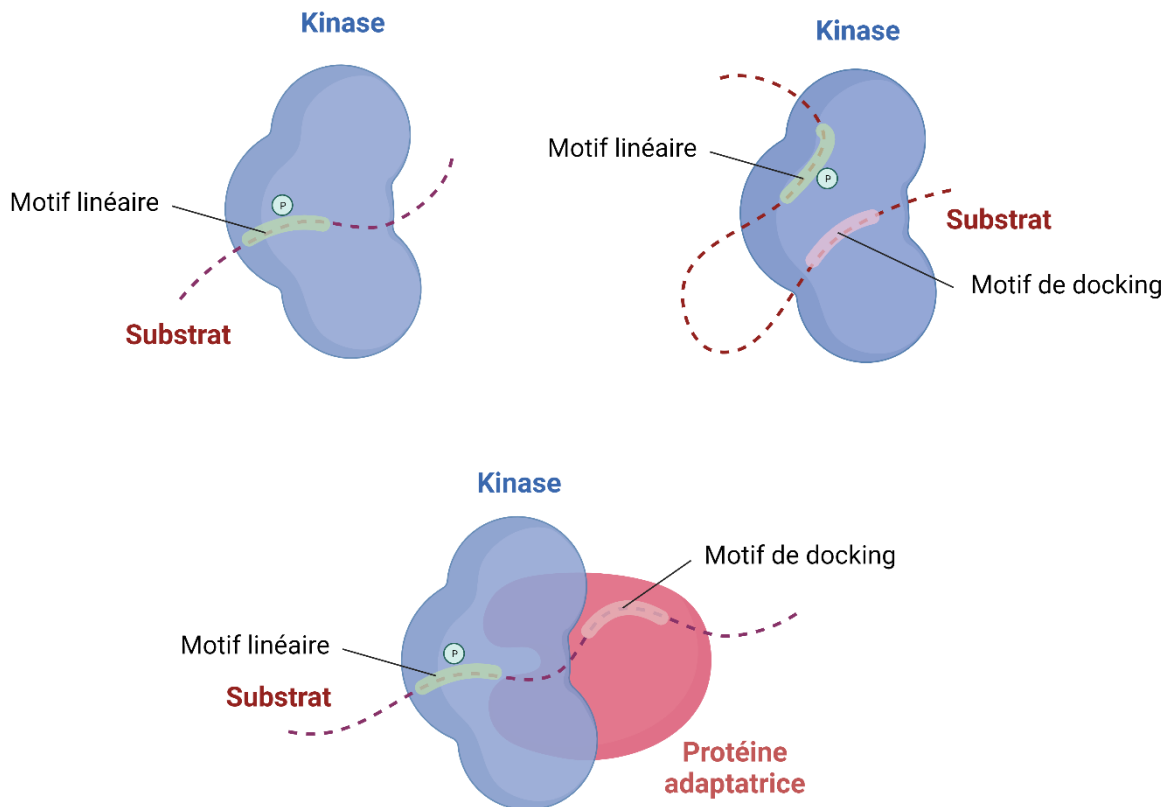


Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires par lesquelles la spécificité enzyme-substrat est obtenue.

Les séquences consensus (motif linéaire) et le docking à distance (motif de docking) sont indiqués. Ces deux mécanismes de reconnaissance peuvent être complémentaires l'un de l'autre.

De part et d'autre du site de phosphorylation, des séquences consensus (motifs linéaires) permettent la reconnaissance du substrat par la protéine kinase. Ces séquences, communément d'une longueur de quatre acides aminés, sont situées à proximité immédiate du site de phosphorylation du côté N-terminal et C-terminal. Elles forment la boucle phosphoacceptrice et sont reconnues spécifiquement par des séquences présentes au sein du site actif de la kinase par complémentarité de charge, de liaisons hydrogènes et/ou d'hydrophobicité [31]. Même si une généralisation semble être difficile, plusieurs séquences consensus ont été mises en évidence pour différentes protéines kinases. Elles peuvent être partagées au sein d'une même famille ou être spécifiques d'une isoforme en particulier [29,31]. De façon intéressante, les LIM kinases ne semblent pas présenter de séquences consensus spécifique au sein de leur site actif. Par ailleurs, le site de phosphorylation de la cofiline se situe tout au bout de l'extrémité N-terminale, au niveau de la troisième sérine (en réalité second acide aminé de la protéine, puisque la méthionine 1 est clivée) ce qui est incompatible avec la reconnaissance d'une séquence consensus de plusieurs acides aminés [32–34].

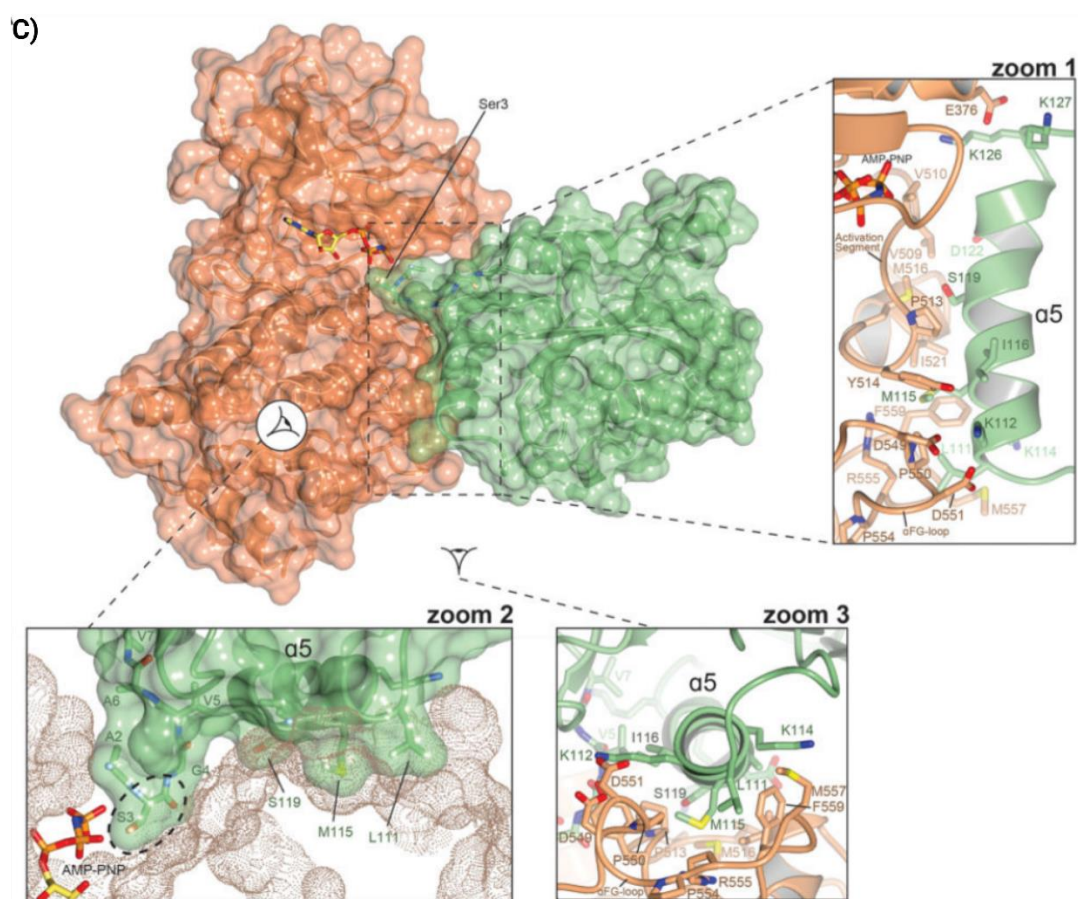
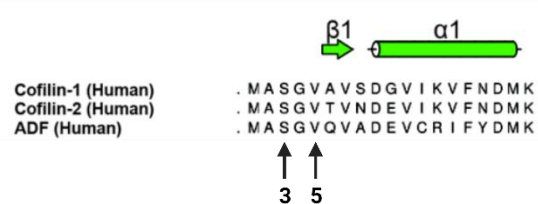
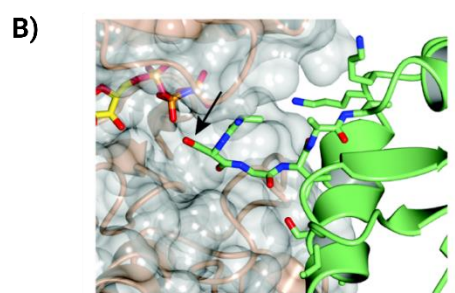
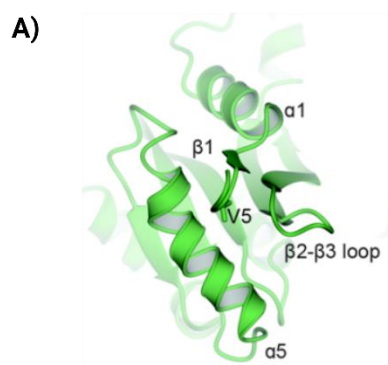
Le docking à distance est un mécanisme de reconnaissance qui permet généralement d'augmenter la spécificité de l'interaction entre l'enzyme et son substrat [29]. Il pourrait agir en augmentant localement la concentration de substrat autour de la protéine kinase. Une flexibilité de la protéine entre le site de docking et le site actif pourrait alors permettre la formation de complexes enzyme/substrat transitoires de façon optimale. Au contraire, le docking pourrait servir à aligner précisément le site de phosphorylation et le site actif, ce qui présupposerait l'existence d'un complexe enzyme/substrat plutôt rigide [29]. Dans tous les cas, la reconnaissance se fait entre un ou plusieurs motifs de docking situés sur le substrat à distance du site de phosphorylation, et un ou plusieurs domaines d'interaction situés sur la protéine kinase. Comme pour les séquences consensus, le docking peut se faire via la reconnaissance de courtes séquences d'acides aminés, ou il peut également se faire via de larges surfaces d'interaction [29,31]. Enfin, la reconnaissance peut se faire directement entre le substrat et la protéine kinase ou via le concours d'adaptateurs ou de protéines d'échafaudage [29,31]. À noter que le docking à distance peut, dans de rares cas, réguler négativement l'activité de la protéine kinase [29].

Il n'y a pas de preuve de docking à distance entre les LIMKs et la cofiline [34]. L'interaction entre les LIMKs et la cofiline ne semble donc pas suivre les règles classiquement observées dans les interactions entre les kinases et leurs substrats. Et effectivement, la résolution de la structure du complexe LIMK-cofiline a mis à jour un tout nouveau mécanisme de reconnaissance [34,35].

En 2016, Hamill et al. mettent en évidence les mécanismes moléculaires de l'interaction entre le domaine kinase de LIMK1 et la cofiline en résolvant la structure tridimensionnelle de ce complexe par cristallographie aux rayons X. Les auteurs insistent sur la structure particulière de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline, qui sert à la fois d'interface entre les LIMKs et la cofiline d'une part, et entre l'actine et la cofiline d'autre part, entraînant une compétition entre les LIMKs et l'actine pour leur interaction avec la cofiline. La valine 5 de l'extrémité N-terminale de la cofiline est prise en sandwich entre cette hélice $\alpha 5$ et les boucles $\beta 2$ - $\beta 3$ de la cofiline. L'hélice $\alpha 5$ se situe donc structuralement proche de l'extrémité N-terminale et donc de la sérine 3 (**Figure 4A**). Cette conformation particulière, où la Valine 5 est prise entre les boucles $\beta 2$ - $\beta 3$ et l'hélice $\alpha 5$, contraint l'extrémité N-terminale à adopter une position extérieure perpendiculaire au domaine d'interface de la cofiline, avec seulement les 2 résidus du côté N-terminal Sérine 3 et Alanine 2 exposés. Les résidus côté C-terminal (résidus 6, 7, 8...), quant à eux, sont enfouis dans le cœur hydrophobe de la protéine et

inaccessibles (**Figure 4B**). Cette conformation particulière ne peut pas permettre la reconnaissance d'une séquence consensus classique de plusieurs acides aminés autour de la sérine 3 phosphoacceptrice [34]. Le mécanisme de reconnaissance du site à phosphoryler de la cofiline par les LIMKs est donc différent. En effet, au cours de l'interaction entre LIMK1 et la cofiline, l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline va venir se loger dans un sillon hydrophobe du lobe C-terminal de LIMK1. Cette insertion va mettre en contact trois résidus très conservés de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline – la leucine 111, la méthionine 115 et la serine 119 – avec des résidus également conservés du sillon de LIMK1. D'ailleurs, des mutants de la cofiline dans cette zone L111/Met115/Ser119 ont montré que ces résidus sont absolument essentiels pour l'interaction entre LIMK1 et la cofiline (**Figure 4C**). La structure du sillon de LIMK1 est elle-même stabilisée par des résidus conservés (proline 550 et 554) et n'est pas modifiée par l'interaction avec l'hélice $\alpha 5$: la structure des LIM kinases les rend disponibles à tout moment pour interagir avec la cofiline. Une fois placée dans le sillon de LIMK1, l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline va servir de guide pour orienter sa sérine 3 directement dans le site actif de LIMK1, où va s'effectuer le phosphotransfert [34]. Cette interaction originale et très spécifique LIMK/cofiline, repose principalement sur la reconnaissance de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline par LIMK et a été nommée *molecular drill jig* par Hamill et ses collaborateurs (**Figure 4D**) [34].

Trois ans plus tard, Salah et al. (2019) publient à leur tour la structure du complexe entre le domaine kinase de LIMK1 et la cofiline, résolue par cristallographie aux rayons X. Leurs résultats sont en parfait accord avec ceux de Hamill et ses collaborateurs, et confirment l'interaction atypique entre LIMK1 et la cofiline. Ils nomment leur interaction « rock-and-poke mechanism ». De manière similaire, l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline s'ancre dans un sillon bien spécifique de LIMK1 ce qui induit un basculement de la Serine 3 dans le site actif de LIMK1 et donc sa phosphorylation très sélective. À nouveau, ils concluent que cette interaction est particulièrement atypique : la serine 3 étant à une extrémité et non au milieu d'une séquence linéaire de plusieurs acides aminés reconnus par l'enzyme dédiée [35].



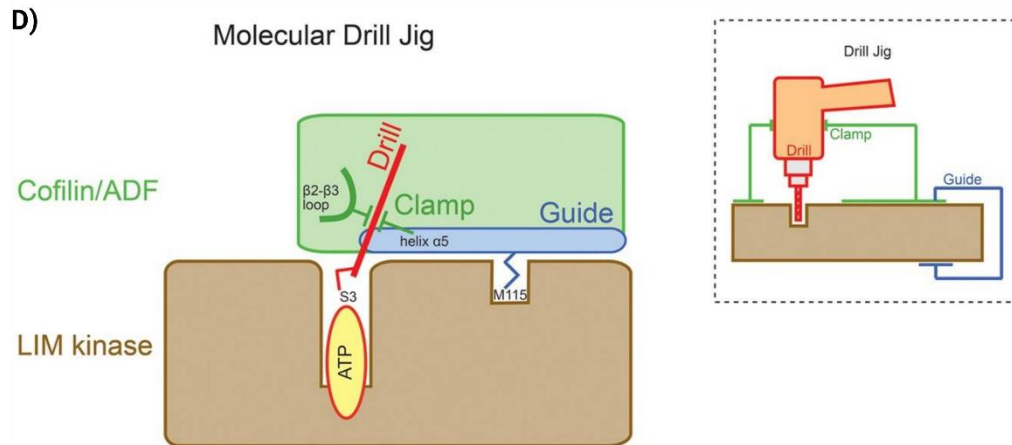


Figure 4 : Mécanisme d'interaction entre le domaine kinase de LIMK1 et la cofiline.

A) La structure de la cofiline bloque sa valine 5 entre son hélice $\alpha 5$ et la boucle des feuillet $\beta 2-\beta 3$. **B)** À gauche, l'extrémité C-terminale de la cofiline est bloquée dans une conformation perpendiculaire à son hélice $\alpha 5$, ce qui oriente de façon rigide sa sérine 3 dans le site actif de LIMK1. La sérine 3 est indiquée par la flèche noire. À droite, alignement des séquences de cofiline-1, cofiline-2 et ADF. **C)** Représentation en boule du complexe domaine kinase de LIMK1 (en orange) /cofiline (en vert) avec le focus sur la zone d'interaction par les différents zooms, mettant en évidence le rôle-clé de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline (zoom 1), la sérine 3 seule pointée vers le site actif de LIMK1, la valine 5 étant enfouie (zoom 2) et le rôle-clé des résidus S119, M115 et L111 de la cofiline (zoom 3) dans cette interaction. **D)** Représentation schématique nommée « Molecular Drill Jig » de l'interaction. L'hélice $\alpha 5$ sert de guide en se fixant dans le sillon de LIMK1, la Met115 étant essentielle dans cette interaction. La sérine 3 est alors positionnée dans le site actif de LIMK1 et le phosphotransfert a lieu dans cette configuration idéale. Figures reprises de Hamill et al. (2016).

II.3. Nouvelle stratégie d'inhibition des LIMKs : bloquer leur interaction avec la cofiline via des stapled peptides.

Ainsi, l'interaction entre les LIMKs et la cofiline est basée sur la reconnaissance de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline dans un sillon bien caractérisé et conservé des LIMKs.

Une nouvelle stratégie d'inhibition des LIMKs nous est alors apparue particulièrement pertinente : abolir cette interaction grâce à un peptide « leurre » qui mimerait cette hélice α et prendrait sa place empêchant alors l'interaction de la cofiline endogène avec les LIMKs.

Les peptides sont aussi une classe de molécules thérapeutiques mais leur manque de pénétration cellulaire et leur instabilité ont été des freins à leur développement. Cependant, un nouveau type de peptides, les *stapled peptides*, lève ces verrous et a relancé l'intérêt de ces molécules en recherche thérapeutique. D'ailleurs, plusieurs *stapled peptides* sont actuellement en phase d'essai clinique.

II.3.1. Cibler les interactions protéine-protéine

Comme cela a été évoqué au cours des chapitres précédents, les interactions protéine-protéine (*protein-protein interaction*, ou PPI) sont au cœur du fonctionnement cellulaire.

Toutefois, les PPIs sont hétérogènes et peuvent revêtir des réalités souvent très différentes. Les PPIs sont généralement caractérisées par de larges surfaces d'interaction (1500-3000 Å²) à la topologie unique, comprenant des “hot-spots” d'interactions spécifiques dispersés tout au long de la surface du ou des partenaires (**Figure 5**) [36,37]. Ainsi, c'est la multiplicité des interactions tout au long de l'interface entre les protéines qui offre aux PPIs toute leur spécificité. À titre de comparaison, les interactions entre protéines et petites molécules couvrent une surface moyenne de seulement 300–1000 Å² [36,38]. Les biomédicaments, et notamment les anticorps monoclonaux, sont adaptés à de telles surfaces d'interactions et ont l'avantage d'être plus sélectifs et plus affins pour leur cible que les petites molécules, ce qui se traduit par des effets secondaires et une toxicité diminués. En conséquence, ils sont généralement mieux tolérés par l'organisme [37,39]. Cependant, notamment du fait de leur taille, ils sont peu biodisponibles, ont une faible perméabilité membranaire et sont plus susceptibles d'être métabolisés. Ils sont donc globalement moins stables que les petites molécules chimiques et également plus coûteux à produire [37,39]. À l'inverse, les petites molécules inhibitrices, qui dominent le marché de l'industrie pharmaceutique depuis plusieurs années et qui ont fait leurs preuves au cours de nombreux d'essais cliniques, ne sont pas nécessairement adaptées à l'inhibition de PPIs parfois complexes, en dépit d'avantages évidents en terme de biodisponibilité, de stabilité intracellulaire, de perméabilité membranaire et de coût de production [37,40] avec toutefois quelques résultats prometteurs [41–43].

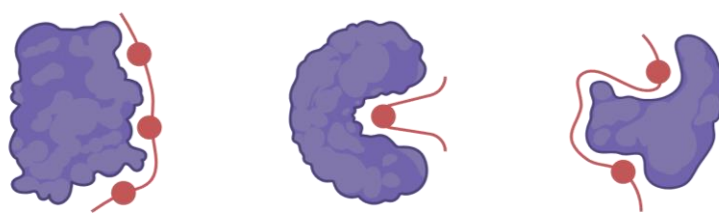


Figure 5 : Les interactions protéine-protéine recouvrent parfois des réalités très différentes.
À gauche, représentation d'une PPIs via de multiples hot-spots d'interaction. Au centre, hot-spot d'interaction niché au cœur de la protéine. À droite, des hot-spots d'interaction de part et d'autre de la surface protéique.

L'intérêt de l'utilisation de peptides réside dans leur potentiel à présenter les avantages des petites molécules chimiques en termes de biodisponibilité et de faibles coûts de production tout en étant plus adaptés et plus spécifiques des interactions protéine-protéine [37,44]. Il est admis que les structures secondaires, et notamment les hélices α et les feuillets β , sont les plus susceptibles d'être impliquées dans des PPIs [45]. Le design rationnel des

peptides passe donc par l'étude structurale de ces éléments et de leur implication dans les interactions protéine-protéine, l'idée étant de mimer leur conformation pour créer des inhibiteurs structuraux capables d'impacter l'interaction entre protéines et cibles déterminées [44]. Malheureusement, ces éléments structuraux ne sont pas stables une fois dissociés de la protéine entière et ont tendance à perdre leur conformation et leurs propriétés biologiques en solution aqueuse [46]. Par ailleurs, les peptides sont plus sensibles à la protéolyse que les protéines entières, ce qui peut limiter leur durée de vie à quelques minutes seulement. De plus, les peptides ont généralement une faible capacité à traverser les membranes lipidiques, ce qui réduit fortement leur pénétration intracellulaire. Ces paramètres diminuent considérablement leur efficacité [37,44]. De fait, une optimisation des peptides est nécessaire pour assurer leur conformation, leur stabilité dans le milieu intracellulaire et leur capacité à pénétrer dans les cellules.

II.3.2. *Historique du développement des stapled peptides*

En 2000, l'équipe de Gregory L. Verdine met au point un système permettant d'augmenter l'hélicité et donc la perméabilité membranaire ainsi que la stabilité métabolique d'un peptide correspondant à l'extrémité C-terminale de la RNase A grâce à une agrafe (« staple ») hydrocarbonée [47], constituant le premier « *stapled peptide* » décrit dans la littérature. Pour ce faire, ils ont substitué deux des acides aminés du peptide par des acides aminés non-naturels (en position i , $i+4$ ou i , $i+7$, ce qui correspond à un tour d'hélice ou deux tours d'hélice) porteurs de chaînes latérales alcéniques de différentes longueurs. Ils ont ensuite mis au point une liaison covalente entre les chaînes latérales des acides aminés par métathèse (selon un procédé décrit par Blackwell et Grubb en 1996). Cette agrafe a été décrite comme inerte d'un point de vue biologique en comparaison des ponts disulfures et lactames utilisés jusque-là. Enfin, ils ont réussi à déterminer quelles étaient les caractéristiques des agrafes qui permettaient une meilleure hélicité du peptide et une meilleure résistance à la protéolyse par la trypsine (longueur des chaînes hydrocarbonées, position et chiralité S ou R des acides aminés...). Ainsi, le *stapled peptide* Ri, $i+7$ S(11) (peptide avec des acides aminés R et S en position i et $i+7$ avec une liaison à 11 carbones) était celui qui présentait les meilleures caractéristiques biologiques [47].

Dans les années qui ont suivi, la recherche sur les peptides cycliques s'est largement intensifiée du fait de leur potentiel à inhiber les interactions protéine-protéine. En conséquence, les connaissances sur la synthèse et l'optimisation de ces peptides se sont,

quant à elles, diversifiées [48]. Il semble évident que le choix des acides aminés à substituer est crucial dans le design du peptide. Les acides aminés impliqués dans l'interaction entre les partenaires ne peuvent pas servir de charpente à la mise en place de l'agrafe, et cette dernière ne doit pas non plus interférer avec l'interaction d'un point de vue structural, par exemple en appliquant une contrainte stérique [49]. Par ailleurs, il est aujourd'hui communément admis que la longueur des chaînes latérales des acides aminés modifiés joue un rôle déterminant dans l'hélicité du peptide et dans la formation de l'agrafe. Une chaîne trop courte ne permet pas la formation de l'agrafe tandis qu'une chaîne trop longue n'offre pas la rigidité nécessaire au maintien de l'hélice [50]. Ainsi, il existe un compromis entre la longueur de la chaîne et le positionnement des acides aminés utilisés pour ancrer l'agrafe. Outre les résultats présentés précédemment en $i, i + 4$ et $i, i + 7$, il a été mis au point avec succès une agrafe de type $i, i + 3$ avec une liaison à 6 carbones, lors de l'optimisation d'un peptide dérivé de la protéine d'enveloppe du gp41 du virus de l'immunodéficience humaine (**Figure 6**) [51].

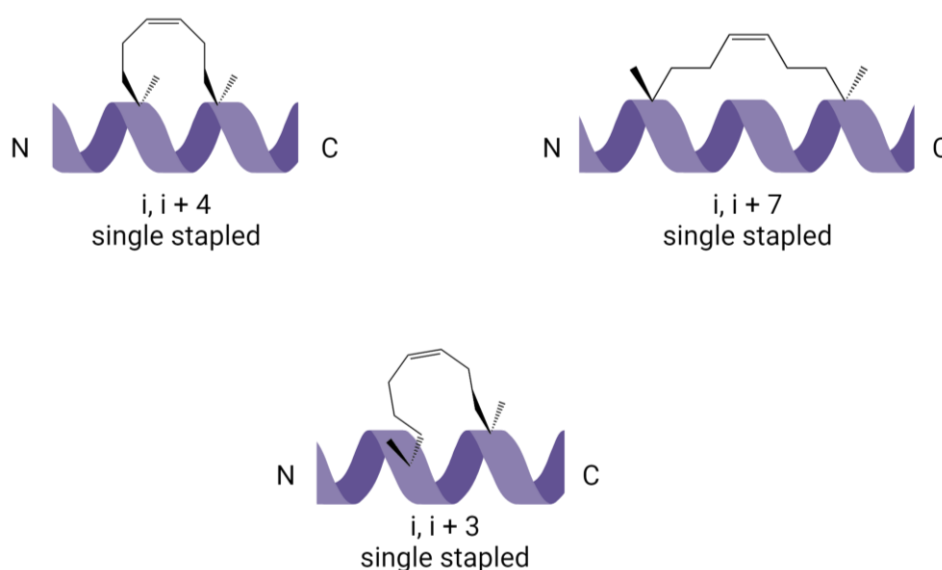


Figure 6 : Représentation schématique de *single stapled peptides* agencés en $i, i+4$, $i, i+7$ et $i, i+3$.

D'autres types d'agrafes que les chaînes hydrocarbonées ont également été développés ces dernières années. Les agrafes perfluoroaromatiques ont comme avantage la possibilité de réaliser la réaction de ligation à température ambiante avec une grande sélectivité, permettant d'éviter d'éventuelles cross-réactions [37]. Les agrafes cystéine développées par Kumita en 2000 tirent profit de la réactivité du thiolate nucléophile lorsque qu'il est mis en contact d'un linker *bis*-électrophile [52,53]. La réaction, qui peut être effectuée en conditions physiologiques (pH 7 à 9), permet l'obtention d'un peptide stable

d'un point de vue structural et métabolique, et dont l'affinité pour sa cible est augmentée [53]. C'est ce processus qui a notamment été utilisé dans le cadre du projet mené en collaboration avec Vincent Aucagne, chimiste des peptides au Centre de Biophysique Moléculaire, sur le développement de peptides inhibiteurs de l'interaction entre les LIMKs et la cofiline.

De la même manière, il apparaît que la longueur du peptide est déterminante dans le choix du nombre d'agrafes utilisées pour assurer sa structure hélicoïdale et sa stabilité [50]. Ainsi, un peptide d'une longueur proche de 30 résidus comme le Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), dérivé du vasoactive intestinal peptide receptor 2 (VPAC2), a nécessité la mise en place d'une double agrafe pour assurer sa résistance à la protéolyse [54]. De la même manière, une étude menée par Cromm et al. (2016) a montré que l'utilisation d'une double agrafe améliorait non seulement la stabilité, mais aussi la perméabilité membranaire et l'affinité d'un peptide cyclique ciblant la GTPase Rab8a [55]. Diverses variations de doubles agrafes ont été également décrites dans la littérature (criss-cross staples, nested staples, stitched staples...) et certaines ont obtenu des résultats particulièrement intéressants (**Figure 7**). En 2022, Jelinska et Kannan, ainsi que leurs collaborateurs, ont notamment mis au point un « stitched peptide » mimant le domaine d'interaction de la protéine oncogénique DAXX (Death domain Associated protein 6) avec ses partenaires. Ils ont montré que ce peptide se liait à DAXX avec une meilleure affinité que les autres peptides testés au cours de cette étude [56]. Jelinska, Kannan et al. (2023) ont également mis en évidence que leur peptide était en mesure de lever l'auto-inhibition de la SUMOylation de la protéine DAXX en se fixant au niveau du motif d'interaction SUMO situé en N-terminal, le rendant ainsi accessible à SUMO-1. En outre, ils ont montré que leur peptide était non-seulement capable d'entrer dans la cellule, mais également d'y rester en grande concentration (de l'ordre du nanomolaire) pendant plus de 24h sans entraîner de désorganisation de la membrane plasmique [57]. Speltz et al. (2018) ont développé un « *cross-stitched* » dans l'optique d'inhiber l'interaction entre le récepteur aux œstrogènes, impliqué dans le cancer du sein, et ses activateurs. Leur *cross-stitched peptide* montrait une meilleure hélicité, une meilleure stabilité et une meilleure affinité pour le récepteur aux œstrogènes qu'un *stapled peptide* à une seule agrafe dirigé contre la même cible [58].

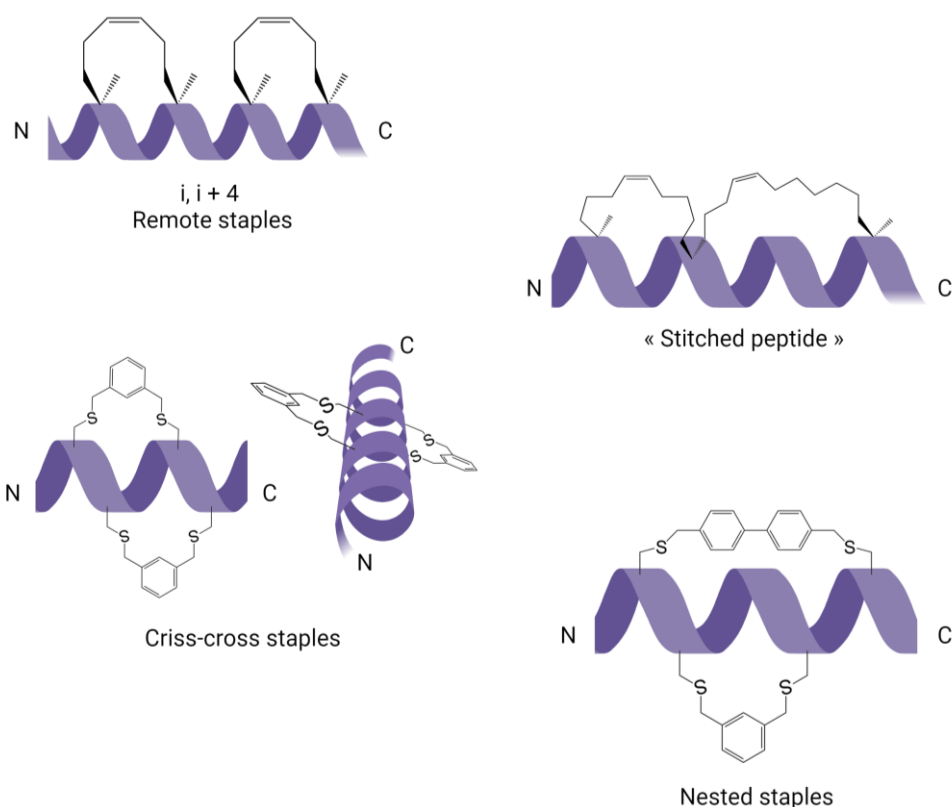


Figure 7 : Représentation schématique des *double stapled peptides remote staples*, *stitched staples*, *criss-cross staples* et *nested staples*.

Aujourd'hui, les *stapled peptides* représentent une réelle opportunité thérapeutique pour l'inhibition des interactions protéine-protéine, offrant une solution intermédiaire entre les petites molécules chimiques et les macromolécules biologiques. Même si, à ce jour, un seul peptide cyclisé est allé jusqu'au stade des essais cliniques [59], de nombreux autres sont en développement, avec des résultats très prometteurs, ouvrant la voie au développement d'une toute nouvelle catégorie d'agents thérapeutiques.

Objectifs

OBJECTIFS DE MA THESE

LIM kinase 1 (LIMK1) et LIM kinase 2 (LIMK2) sont des protéines impliquées dans de nombreux processus essentiels à la vie cellulaire tels que la division cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose, via de nombreuses voies de signalisation. Elles jouent notamment un rôle crucial dans la dynamique du cytosquelette en phosphorylant la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine, qu'elles vont inhiber, empêchant ainsi le remodelage des filaments d'actine. LIMK1 et LIMK2 participent également au remaniement des microtubules, par un mécanisme encore inconnu à ce jour.

Du fait de leur rôle clé dans la dynamique du cytosquelette, les LIM kinases sont aussi impliquées dans de nombreux phénomènes pathologiques, comme le cancer, les maladies neurologiques, les neurofibromatoses ou encore les infections virales. Elles constituent donc des cibles thérapeutiques d'intérêt. De nombreux inhibiteurs « petites molécules chimiques » ont été développés contre les LIMKs, mais seulement un a atteint le stade clinique, sans résultats publiés. Pour développer de nouvelles stratégies d'inhibition originales, sélectives et efficaces, il est donc essentiel de mieux comprendre le mode d'action et de régulation de ces kinases sur leur substrat, d'un point de vue moléculaire, tout particulièrement vis-à-vis de leur substrat canonique, la cofiline.

Des travaux antérieurs réalisés par des étudiantes de Master 2 ont mis en évidence que l'intégralité du domaine kinase de LIMK2 n'est pas suffisante pour permettre la phosphorylation de la cofiline, et que l'extrémité C-terminale est indispensable pour ce processus. De plus, en l'absence de cette extrémité C-terminale, LIMK2 n'est plus phosphorylée. Cette observation a laissé supposer l'existence d'un site de phosphorylation au niveau de l'extrémité C-terminal, qui serait nécessaire à l'activité de LIMK2 sur la cofiline. Le point de départ de ma thèse est basé sur ces observations et vise à comprendre le rôle moléculaire de cette extrémité C-terminale dans la régulation de l'activité kinase des LIMKs vis-à-vis de leur substrat canonique, la cofiline.

Ainsi, la majeure partie de ma thèse a été consacrée à l'élucidation des mécanismes moléculaires nécessaires à l'activité des LIM kinases sur la cofiline. Grâce à l'étude de mutants ponctuels de l'extrémité C-terminale, j'ai ainsi pu décrire un tout nouveau

mécanisme d'activation des LIM kinases, médié spécifiquement par un acide aminé de l'extrémité C-terminale : la tyrosine 632 pour LIMK1, 630 pour LIMK2.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu la chance de participer à l'initiation du projet « *Stapled peptides* » en collaboration avec l'équipe de chimie des peptides dirigée par Vincent Aucagne au Centre de Biophysique Moléculaire. Ainsi, j'ai pu mener des études d'activité de LIMK2 en présence des *stapled peptides* synthétisés par nos collaborateurs et voir leur efficacité pour l'inhibition de l'interaction entre les LIMKs et la cofiline. Les résultats préliminaires que j'ai obtenus au cours de ma thèse ont permis de déposer une demande d'ANR à l'automne 2022 qui n'a malheureusement pas été retenue en phase finale malgré de très bons retours. Ce projet ANR a été redéposé en octobre dernier et a été sélectionné pour financement en juillet 2024.

Au cours de ma thèse, j'ai également contribué au développement d'une nouvelle méthode d'analyse de l'interaction entre les LIMKs et des inhibiteurs petites molécules par Thermophorèse à Micro-Echelle, en collaboration avec l'équipe de chimie analytique de l'ICOA (R. Nehmé et R. Nasreddine) via l'encadrement d'une stagiaire de Master 2. Ces études sont précieuses car dans l'équipe sont aussi développés des inhibiteurs « petites molécules » des LIMKs en collaboration avec les équipes de chimie médicinale de l'ICOA (S. Routier et K. Plé) et de chémoinformatique (P. Bonnet et S. Aci-Sèche). Cet essai permet de travailler directement sur des lysats cellulaires dans lesquelles les LIMKs sont surproduites, ces dernières ayant été fusionnées à une protéine émettant dans le proche infrarouge, mRFP670. La mise au point de cet essai permet d'envisager des criblages de molécules et/ou inhibiteurs par une technique sensible en s'affranchissant de l'étape fastidieuse de purification des LIMKs. Ma contribution dans ce travail a été remise en cause par Reine Nehmé à la toute fin de la rédaction de ma thèse. Aussi, j'ai dû retirer ces travaux de mon manuscrit pour le soumettre dans les temps et ne pas compromettre ma soutenance. Le Comité à l'Intégrité scientifique et à la Déontologie de la Recherche (CIDR) de l'université d'Orléans a alors été saisi, et a reconnu, depuis, mon implication dans ce travail qui est présenté en **Annexe 1** en accord avec les recommandations de mes rapporteurs.

Résultats

RESULTATS

I. Mécanismes moléculaires régulant l'activité des LIMKs

I.1. Introduction

Le premier objectif de ma thèse était d'élucider les mécanismes moléculaires nécessaires à l'activité des LIMKs sur leur substrat, la cofiline. Les résultats issus des données préliminaires, auxquels ont été ajoutés ceux de ma thèse, font l'objet d'un article mettant en lumière des déterminants moléculaires cruciaux impliquant l'extrémité C-terminale de LIMK2 sur son activation et sur la régulation de son activité kinase. Cet article sera soumis en 2024.

I.2. Article

LIM kinase, LIMK1 and LIMK2, activity regulation: a new unexpected mechanism triggering their function on cofilin and actin filament remodelling

Elodie Villalonga ¹, Samia Aci-Sèche ², Déborah Cassas ¹, Céline Chalal ¹, Michel Doudeau ¹, Christine Mosrin ¹, Fabienne Godin ¹, Pascal Bonnet ², Hélène Bénédicti ¹ and Béatrice Vallée ^{1,*}

¹ Centre de Biophysique Moléculaire ; UPR4301, CNRS, University of Orléans, and INSERM, 45071 ORLEANS Cedex2, France; elodie.villalonga@cnrs-orleans.fr, christine.mosrin@cnrs-orleans.fr, michel.doudeau@cnrs-orleans.fr, fabienne.godin@cnrs-orleans.fr, helene.benedetti@cnrs-orleans.fr, beatrice.vallee@cnrs-orleans.fr

² Institut de Chimie Organique et Analytique ; UMR7311 ; CNRS, University of Orléans, 45071 ORLEANS Cedex2, France ; samia.aci-seche@univ-orleans.fr

Introduction

LIM kinases are playing a crucial role in cell fate. Due to their role in cytoskeleton remodelling [60–64], they regulate many physiological processes such as cell cycle [65–70], cell migration and motility [22,71–75], neuronal differentiation [76–80] and apoptosis [81–

84]. As a consequence, their implication in numerous pathologies has been shown: oncogenesis [85–91], viral infections [92–96], development of neurological and neurodegenerative diseases [97–102] and neurofibromatosis [22,103–105]. They are also a node in several signalling pathways due to their extensive partners' network [1].

As promising therapeutic targets, many small molecule inhibitors targeting their active site have been developed these last 15 years. However, they failed to reach clinical stages [6,106]. It is then vital to have a better understanding of LIMK functions and regulations at the molecular level to go further into their characterization and be able to develop successful therapeutic strategies.

LIM kinases (LIMKs) are serine/threonine and tyrosine kinases. LIM kinase family consists of only two members: LIMK1 and LIMK2, encoded by two different genes (ENSG00000106683, ENSG00000182541) [30]. These proteins are closely related, they share 50% overall identity and 70% identity in their kinase domain [2,30]. They are structured in two LIM (Lin11, Isl-1 and Mec-3) domains at their N-terminus, each composed of two zinc fingers, a central PDZ domain followed by an unstructured proline/serine (P/S) rich region, and a C-terminal kinase domain [30]. Even though they are highly related, LIMK1 and LIMK2 display different cell-type expressions and subcellular localizations, indicating that they may not have completely overlapping functions [63,70,107,108]. In the literature, LIM kinases are mainly described for their role in the remodelling of the cytoskeleton, notably through their activity on cofilin, a member of the Actin Depolymerizing Factor (ADF) family. When phosphorylated by LIM kinases on its serine 3 (S3), cofilin is inhibited, resulting in actin fiber polymerization and formation of stress fibers [60–62]. LIMKs also play a role in microtubules turnover, but the mechanism by which they are involved in this phenomenon is yet to be determined [64,109].

Canonically, LIM kinases act as downstream effectors of the members of the Rho GTPase family, including Rho, Rac and Cdc42, which modulate LIMK activity via their effectors, Rho-associated protein kinases (ROCK), myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK α), and p21-activated kinases (PAK), PAK1, PAK2, and PAK4. LIMK1 and LIMK2 are activated by phosphorylation of their threonine 508 (T508) and threonine 505 (T505), respectively [61,110]. However, it is now well-established that they have many more partners, regulators, substrates and are, in fact, at the very heart of a vast network of protein-protein interactions [1].

Our previous study of the isoforms of LIMK2 has uncovered intriguing features on these proteins. Three isoforms of human LIMK2 are described in the literature: LIMK2a, LIMK2b, and LIMK2-1, a Hominidae-specific isoform [111–114]. Those three isoforms display different tissue-specific expressions, as well as different subcellular localizations, indicating that they may not have exactly the same functions [114]. For instance, LIMK2 expression upon p53 activation after DNA damage is isoform-dependent: LIMK2b and LIMK2-1, but not LIMK2a, are upregulated, and leads to G2/M arrest via a cofilin phosphorylation increase [65]. LIMK2b and LIMK2-1 isoforms differ only from full-length LIMK2a at their extremities. The first LIM motif is truncated at the N-terminus of LIMK2b and LIMK2-1, whereas LIMK2-1 has an extra C-terminal domain identified as a Protein Phosphatase 1 inhibitory (PP1i) domain by sequence homology (**Figure 1**) [111–113].

We have previously shown that contrary to LIMK2a and LIMK2b, LIMK2-1 has no kinase activity on cofilin, whereas it has a kinase activity on Myelin Basic Protein (MBP), a universal kinase substrate, and it is able to promote actin polymerization [112]. Moreover, it is activated by upstream kinases on canonical activation site (T484 for LIMK2b and LIMK2-1, homolog to T505 in LIMK2a) and it is able to interact with cofilin, indicating that its lack of kinase activity on cofilin is not due to a default in its kinase domain activity nor in its ability to interact with its substrate ([112] and data not published). In fact, we showed that LIMK2-1 acts as an inhibitor of the Protein Phosphatase 1, a protein that is known to dephosphorylate and activate cofilin [112]. Thus, LIMK2-1 would participate in the increase of the phosphorylated cofilin pool by preventing its dephosphorylation rather than by phosphorylating it, as the two other isoforms do [112]. Consequently, small molecules inhibitors targeting LIMKs active site might be inefficient towards LIMK2-1 and this isoform could constitute a bias in therapies targeting LIMKs.

These results strongly suggest that we are still missing a thorough understanding of the molecular determinants essential for LIMK activity on cofilin. Hence, it is necessary to go further into the elucidation of the molecular mechanisms required for the kinase activity of LIMK on cofilin.

In the present study, we showed that the kinase domain of LIMK2 is not sufficient for it to phosphorylate cofilin, and that the very end of its C-terminal domain is also necessary. We showed that a single amino acid, tyrosine 630 for LIMK2a (Y630), tyrosine 632 (Y632) for LIMK1, is critical for their activity on cofilin. This amino acid mediates

LIMK dimerization and transphosphorylation, which seems to be a prerequisite for LIMK2 and LIMK1 well-characterized activation by upstream kinases on T505 and T508, respectively. Our results unravelled an unexpected regulation of LIMK activation.

Material and methods

Materials

Anti-ROCK-1 (sc-17794) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc, anti-HA (11867423001) antibody from Roche Applied Science, anti-P-LIMK1 (T508)/LIMK2 (T505) (3841S), cofilin (5175S) and Phospho-cofilin (3313L) antibodies from Cell Signalling Technology. Anti-GFP antibody was purchased from Takara (632592), as well as TALON® Metal Affinity Resin for 6xHis-tagged protein purification (635502). EZview™ Red anti-HA affinity gel (E6779) was purchased from Sigma-Aldrich Co, as well as anti-actin (A1978) antibody and cycloheximide (C-7898). GFP-Catcher beads were purchased from antibodies-online (ABIN5311508). Lipofectamine™ 2000 was purchased from Invitrogen (11668019). Recombinant MBP was purchased from Millipore (2243486).

Expression and purification of cofilin-1

6xHis-tag cofilin plasmid was transformed in Rosetta™(DE3)pLacI Competent Cells, according to the manufacturer instructions. Transformed colonies were selected on LB plates with ampicillin and chloramphenicol (100 µg/mL), used to generate 50 mL overnight cultures which were used to inoculate 2L of LB supplemented with ampicillin and chloramphenicol (100 µg/mL). Cultures were grown at 37 °C with shaking at 180 rpm until the OD_{600 nm} reached 0.8. Expression of cofilin-1 was then induced with 100µM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 16°C overnight with shaking at 110 rpm. The induced cells were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C and resuspended in 30 ml of TBS buffer (20mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl). The cells were then lysed using a sonicator in presence of a cocktail of proteases inhibitors (S8830, Sigma-Aldrich). Finally, cells were ultracentrifuged at 30,000 rpm for 30 minutes at 4°C. Proteins of interest, tagged with 6-histidine, were purified by immobilized metal affinity chromatography using TALON Metal Affinity Resin. Non-specific proteins were eluted using low concentrations of imidazole (10-20 mM), Cofilin-1 was eluted using 150mM of imidazole. Fractions containing the fusion protein were then pooled and dialyzed overnight at 4°C into TBS buffer at pH 8. A second dialysis was performed the following day for 4 hours. The proteins were

then concentrated using Amicon® Ultra-4 (UFC800324, Merck-Millipore) for further analysis.

Plasmid construction

Plasmids were constructed in NEB 10 β Competent *E. coli* using Q5 high-fidelity DNA polymerase, according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated with NucleoSpin Plasmid Mini Kit and, when necessary, extracted from an agarose gel with NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). All constructs were verified by restriction digest and Sanger sequencing. Primer synthesis and Sanger sequencing were conducted by Eurofins Genomics Europe (Luxembourg, Luxembourg). Oligonucleotides and plasmids used in this study are listed in supplementary data, **Table 2** and **Table 3**, respectively.

Cell culture and transfection

HEK-293 (CRL-1573 TM) and HeLa cells (CRM-CCL-2 TM) were cultured under 5% CO₂ at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum. HEK-293 cells were transiently transfected with 10 μ g of plasmid per 100-mm dish or 5 μ g of plasmid per well of 6-well plates with Calcium Phosphate method. HeLa cells with transiently transfected with 0,8 μ g of plasmid per well of 4-well plates with Lipofectamine 2000 according to manufacturer's recommendations. Further experiments were conducted 48 hours after transfection.

Cell lysates for protein detection

HEK-293 cells were lysed in 0,1 % Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM β -glycerophosphate, 10 μ g/mL aprotinin, 005 μ g/mL okaidic acid, 1 μ g/mL leupeptin, and 1 mM PMSF) on ice for 10 minutes. Upon 10 minutes centrifugation at 10.000xg, supernatants were collected and Laemmli buffer was added. Cell lysates were stored at -80°C for further western blot analysis.

Immunoprecipitation

HEK-293 cells were transfected with expression plasmids as described above, and cultured for 48 hours. Cells were then lysed as described above. Supernatants were incubated for 2 hours at 4°C either with anti-HA affinity gel for HA-LIMK2 constructs or with GFP-

trap beads for YFP-LIMK2 constructs. Beads were then washed five times with lysis buffer, and then eluted with Laemmli sample buffer.

Kinase assay

Immunoprecipitates bound to HA-beads or GFP-beads, as described above, were washed twice with lysis buffer and then three times with kinase buffer (50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β -glycerophosphate, 1 μ g/mL leupeptin, and 1 mM PMSF). Immunoprecipitated beads were incubated for 20 minutes at 30°C in 22 μ l of kinase buffer containing 50 μ M ATP, 5 μ Ci of γ [³²P]ATP (3,000 Ci/mmol) and 2 μ g of purified 6xHis-tag cofilin or 10 μ g of commercial MBP. The reaction was terminated by heating 5 minutes at 90 °C in Laemmli sample buffer. Samples were then subjected to SDS-PAGE, and analysed by autoradiography.

Cell staining

HeLa cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes and permeabilized with 0.5% Triton-X100 in PBS for 10 minutes at room temperature. After blocking with 0.1% Triton-X100, 2% BSA, 0.1% Azide in PBS for 10 minutes, cells were incubated with anti-HA antibody for 1 hour and subsequently with FITC-conjugated anti-rat IgG for 45 minutes. AlexaFluor568-conjugated phalloidin was added 20 minutes before the end of the secondary antibody incubation. The cells were washed three times with 0.1% Triton-X100 in PBS and nucleus was stained using Hoechst for 10 minutes. The cells were then washed three more times with 0.1% Triton-X100 in PBS, mounted on glass slides, and analyzed by fluorescence microscopy using Carl Zeiss Axio Observer Z7 (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany). Images were acquired using ZEN v2.3 pro Zeiss software (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany).

Cycloheximide chase assay

HEK-293 cells were cultured and transfected with expression plasmids as described above. After 48 hours of transfection, cells were treated with 100 μ g/mL of cycloheximide at indicated chase time. At the end of the assay, cell samples were collected simultaneously, and lysed as described above. Cell lysates were stored at –80°C before further western blot analysis.

Bioinformatics analysis

Alignments of protein sequences of the C-terminal extremity of LIMK2a in different species were obtained by performing Multiple Sequence Alignment (MSA) from UniProt Align tool. Evolutionary rate of each amino acid position in LIMK2 protein was generated using ConSurf Data Base tool. Further analysis of Y630A mutation impact on protein integrity were performed using PolyPhen-2 and Mutation t@ster prediction tools.

Statistics

All experiments were repeated at least three times. The data were analysed and the figures were generated with Prism GraphPad 9 software (GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA). The results are presented as mean $\pm$ SEM of at least three biological replicates. First, normality of data was assessed with Shapiro-Wilk test. Statistical significance was then determined using one-way ANOVA followed by post-hoc tests using Tukey's multiple comparisons test (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Results

The C-terminal extremity of LIMK2 is required for its kinase activity on cofilin and its own phosphorylation

Major differences between LIMK2a/2b and LIMK2-1 lie at their C-terminal extremities (**Figure 1**). LIMK2-1 has a truncated kinase domain compared to LIMK2a (a few amino acids), followed by a PP1i domain. As LIMK2-1 has no kinase activity on cofilin, we thought that these missing amino acids may be required for its activity on cofilin.

We constructed two truncated mutants missing various length of the C-terminal extremity of the kinase domain of LIMK2a: LIMK2a- Δ CT591 and LIMK2a- Δ CT602 (**Figure 2A**). LIMK2a- Δ CT591 corresponds to the truncated kinase domain of LIMK2-1, whereas LIMK2a- Δ CT602 corresponds to the full-length kinase domain of LIMK2a, as described in sequence analysis databanks. None of these two mutants was able to phosphorylate cofilin in vitro nor in cellulo (**Figure 2B and 2C**). The 3D structure of the kinase domain of LIMK2a shows that mutant LIMK2a- Δ CT602 is missing half of the penultimate α -helix (**Figure 2A**), so we decided to construct two more mutants: LIMK2a- Δ CT609, bearing the full-length penultimate α -helix, and LIMK2a- Δ CT611, bearing two more amino acids, including a proline residue that might be important. Once more, none of these two mutants was able to phosphorylate cofilin in vitro nor in cellulo (**Figure 2B and**

2C). Interestingly, while performing these kinase assays on cofilin, we noticed that these four truncated mutants were no longer phosphorylated in our in vitro assay (**Figure 2D**).

These data suggest that one or several residues present at the C-terminal extremity (between amino acids 612 and 638) of LIMK2a are required for both LIMK2a phosphorylation and cofilin phosphorylation by LIMK2a.

LIMK2a-Y630A mutant does not phosphorylate cofilin

At the very C-terminal extremity of LIMK2a, five amino acids (T625, S627, Y630, T633 and S636) are potential sites of phosphorylation (**Figure 3A**). By site-directed mutagenesis, we mutated them one by one into alanine residues, and tested the kinase activity of each of these mutants on cofilin.

HEK-293 cells were transfected with a plasmid allowing the expression of either LIMK2a wild-type (WT) or each of these mutants or the unrelated protein Larp6.

In vitro γ [³²P]ATP labelling, as well as in cellulo experiments, showed that LIMK2a-Y630A was unable to phosphorylate cofilin whereas the other mutants phosphorylated cofilin at the same level as WT LIMK2a (**Figures 3B and 3C**).

We then looked at cytoskeleton remodelling induced by LIMK2a by immunofluorescence, labelling actin filament with phalloidin. Indeed, LIMK2 overexpression is known to induce actin polymerization leading to stress fiber formation. HeLa cells were transfected with a plasmid allowing the expression of either LIMK2a WT, LIMK2a-Y630A or the unrelated protein Larp6. Contrary to LIMK2a WT, LIMK2a-Y630A is unable to induce stress fibers, suggesting that this mutant is inactive on actin filament polymerization (**Figure 3D**). This result is in good agreement with our in vitro and in cellulo results.

We then tested if LIMK2a-Y630A loss of kinase activity was cofilin-specific or if it was more general towards any substrates. We used MBP, a protein known to be a broad substrate of many kinases, and tested if LIMK2a-Y630A could phosphorylate it in our in vitro assay (**Figure 3E**). LIMK2a-Y630A did phosphorylate MBP, suggesting that its kinase domain is functional. LIMK2a-Y630A loss of kinase activity seems to be specific of cofilin substrate.

We then checked if the role of this tyrosine 630 was also conserved in LIMK1. Tyrosine 630 of LIMK2 corresponds to tyrosine 632 in LIMK1. We constructed the LIMK1-

Y632A mutant and tested its activity on cofilin by our vitro assay. LIMK1-Y632A was unable to phosphorylate cofilin (**Figure 3F**). These results confirm that the role of this tyrosine is conserved in both LIMK1 and LIMK2.

Along this line, we analysed the conservation of this tyrosine among evolution. BLAST alignments revealed that this tyrosine is extremely conserved among species. ConSurf analysis emphasized the conservation of this tyrosine among evolution (**Figure 3G**). We also wanted to assess the consequence of the mutation of tyrosine 630 in protein function using Polyphen and Mutation Taster tools. Both analysis revealed that mutation of tyrosine 630 was deleterious for LIMK2a (**Figure 3H**).

LIMK2a-Y630A mutant downstream and upstream partners

As LIMK2a-Y630A is unable to phosphorylate cofilin, we wondered if it was still able to interact with its substrate cofilin. By co-immunoprecipitation experiments, we showed that transfected YFP-LIMK2a-Y630A interacted with endogenous cofilin (**Figure 4A**). Lack of kinase activity of LIMK2a-Y630A on cofilin is then not due to a loss of interaction between this mutant and cofilin.

ROCK is one of the upstream kinases activating LIMK2 by phosphorylating it on its threonine 505. We studied the interaction between LIMK2a and ROCK. By co-immunoprecipitation experiment, we showed that LIMK2a-Y630A interacted with ROCK (**Figure 4B**). Then, we checked if LIMK2a-Y630A was still activated by ROCK via the phosphorylation of its T505 by western-blot analysis using an anti-phospho-T505 LIMK specific antibody. It appeared that ROCK did not phosphorylate LIMK2a-Y630A on its T505 (**Figure 4C**).

Which process is mediated by tyrosine 630?

Our results show that Y630 of LIMK2 as well as Y632 of LIMK1 are required for LIMK activity on cofilin and for LIMK phosphorylation on their threonine belonging to the activation loop. We wanted to know more about the role of this amino acid.

As mutation of tyrosine 630 into an alanine leads to loss of LIMK phosphorylation on cofilin in our vitro assays, we speculated that this tyrosine may be phosphorylated and that this phosphorylation might be a prerequisite for T505 phosphorylation, bringing an explanation to the loss of phosphorylation of LIMK2a-Y630A on its T505.

First, we mutated tyrosine 630 into another phosphorylatable amino acid, serine (S). We performed our in vitro assay of cofilin phosphorylation on this new mutant. LIMK2a-Y630S was unable to phosphorylate cofilin (**Figure 5A**). Furthermore, LIMK2a-Y630S was not phosphorylated in our in vitro assay (**Figure 5B**).

We then decided to mutate Y630 into the phosphomimetic amino acid glutamic acid (E) and performed the same experiment with this mutant. In our in vitro assay, LIMK2a-Y630E mutant was unable to phosphorylate cofilin (**Figure 5A**) and was not phosphorylated on its own (**Figure 5B**).

Our results suggest that Y630 phosphorylation hypothesis may be not so relevant. So we hypothesized that Y630 may play an important role related to its structure. We decided to mutate Y630 into phenylalanine (F), a closely related amino acid from a structural point of view. We performed our in vitro cofilin phosphorylation assay with this new mutant. Interestingly, this mutant was able to phosphorylate cofilin at the same level as WT LIMK2a (**Figure 5A and 5C**). We also checked in cellulo phosphorylation of cofilin mediated by this mutant. It also restored WT level of phospho-cofilin. Furthermore, LIMK2a-Y630F mutant was phosphorylated in our in vitro assay (**Figure 5B**). ROCK phosphorylation on T505 was also fully restored for this mutant (**Figure 5D**).

Y630/Y632 and LIMK2/1 conformation

Our results suggest that tyrosine 630 is not phosphorylated and rather play a structural role, crucial for LIMK2a activity on cofilin.

We went further into our study by investigating the impact of this tyrosine 630 in LIMK2a conformation. We superposed all of the 3D structures of the kinase domains of LIMK1 and LIMK2 resolved by X-ray crystallography and depicted in the protein databank (see **Figure 6A**).

It appeared that tyrosine 630 adopts two different well-defined conformations: so-called “in” and “out” conformations depending on whether the residue is turned towards the α C-helix or not (**Figure 6A**).

Even more interestingly, the position of the tyrosine 630 seems to be correlated to the status of the α C-helix of LIMK, a conserved structural motif involved, along with DFG motif, in the balance between active and inactive conformation of the protein. Indeed, in these structures when Y630 adopts an “out position”, the α C-helix adopts an in-

conformation, meaning that the conserved glutamic acid (E376/384 in LIMKs) in the α C-helix forms a salt bridge with the conserved b3 lysine (K360/368 in LIMKs). On the opposite, when Y630 adopts an “in position”, the α C-helix is in an out-conformation, meaning that the α C-Glu is turned away from the active site, leading to a displacement of the α C-helix. (**Figure 6A**).

These results suggest that tyrosine 630 may mediate the conformation of the α C helix. As mentioned before, DFG motif and α C-helix are involved in the conformational state of the catalytic domain of LIMK, inactive or active, which is responsible of its T505/T508 phosphorylation. And, indeed, our results showed that LIMK2a-Y630A is not phosphorylated on its T505, whereas LIMK2a-Y630F is. These data suggest that the aromatic ring of tyrosine 630 plays a crucial role for LIMK2 conformation and activation on its T505.

We decided to investigate if we could bypass the role of this tyrosine by taking advantage of the constitutively active mutant LIMK2a-T505EE [110]. We constructed a double mutant combining T505EE and Y630A mutations. We performed our in vitro assay with this new mutant and compared its activity on cofilin with WT LIMK2a and LIMK2a-Y630A mutant. Surprisingly, this double mutant was not able to phosphorylate cofilin at all (**Figure 6B**). It appeared that when Y630 is mutated in alanine, T505EE is unable to mimick and bypass ROCK activation.

It is well-established that T505 phosphorylation is required for LIMK2 activity on cofilin. However, these results suggest that this phosphorylation is not sufficient for LIMK2 optimal kinase activity on cofilin. Tyrosine 630 seems to mediate a process necessary for LIMK2 optimal activity.

LIMK2 self-phosphorylation occurs by a transphosphorylation triggered by its dimerization

As our data from the in vitro assay showed that LIMK2a is phosphorylated on its own, and that this phosphorylation is lost when Y630 is mutated into alanine, we hypothesized that Y630 may trigger LIMK2a phosphorylation on one or several sites different from T505, as LIMK2a-T505EE was still phosphorylated in our in vitro assay.

First, we wanted to assess how the phosphorylation process mediated by Y630 may occur. Three hypothesis were explored: i) the phosphorylation could be triggered by another

kinase, ii) it could result from a transphosphorylation, or iii) from an autophosphorylation. Indeed, LIM kinases are known for their ability to dimerize (homodimer and heterodimer) and transphosphorylate with the support of Hsp90 protein, which results in an increase of LIMK stability and activity. LIMKs are also described to be able to autophosphorylate [115].

To decipher between these three different possibilities, we took advantage of two mutants well-described in the literature: LIMK2a-D451N and LIMK2a-P386E. LIMK2a-D451N is a kinase-dead mutant of LIMK2a unable to phosphorylate cofilin or itself, while P386E mutation disrupts the interaction between LIMKs and Hsp90 and prevent LIMKs dimerization and transphosphorylation [116].

We performed our in vitro assay with these two mutants. As expected, LIMK2a-D451N was unable to phosphorylate cofilin. Moreover, it was not phosphorylated on its own (**Figure 7A**). This result suggests that another kinase is not responsible for LIMK2a phosphorylation in these conditions. LIMK2a-P386E did not phosphorylate cofilin and was not phosphorylated either (**Figure 7A**). These results show that LIMK2a phosphorylation is abolished when dimerization is disrupted indicating that, in our assay, LIMK phosphorylation is neither the result of a phosphorylation by another kinase, nor the result of an autophosphorylation, but the result of a transphosphorylation.

Altogether, these data suggest that Y630 may rather be involved in LIMK2a dimerization and transphosphorylation, and that this process is required for its activity on cofilin.

Y630 plays a crucial role for LIMK2 dimerization, mediating its transphosphorylation which is crucial for LIMK2 activity on cofilin

Then we wanted to assess if Y630 could play a role in LIMK2a ability to dimerize and transphosphorylate.

First of all, we studied if Y630 is really involved in LIMK2a dimerization. We studied the interaction between WT LIMK2a and LIMK2a mutants Y630A or Y630F by co-immunoprecipitation experiment. These different HA-tagged constructions were co-transfected with YFP-tagged WT LIMK2a. An immunoprecipitation with anti-GFP grafted beads was performed. It appeared that LIMK2a-Y630F mutant was able to interact with WT LIMK2a, whereas LIMK2a-Y630A was not (**Figure 7B**). These results show that Y630 mutation into alanine seems to abolish LIMK2a ability to homodimerize.

It was previously shown that LIMK2 stability is correlated to its ability to dimerize [116]. So, we evaluated LIMK2a-Y630A and LIMK2a-Y630F lifespan taking WT LIMK2a as a reference. For this purpose, we performed a cycloheximide chase assay. Cycloheximide prevents protein neosynthesis and this treatment allows to determine the lifespan of the proteins of interest. HEK cells transfected with one of the different mutants of LIMK2a were incubated with cycloheximide for different times. LIM kinases are very stable proteins with a lifespan around 20 hours. Strikingly, kinase-dead mutants and non-homodimerizable mutants were shown to have a very reduced lifespan of approximately 4 hours [116]. In our experiments, LIMK2a-Y630A rapidly and drastically decreased. Upon 1 hour of cycloheximide treatment, the signal of LIMK2a-Y630A dropped to 50% and reached 10% protein left only upon 2 hours of treatment. (**Figure 7C**). On the opposite, LIMK2a-Y630F lifespan did not seem to be affected, with a constant protein signal all along our time course. In this range of time, LIMK2a-Y630F is as stable as WT LIMK2 (**Figure 7C**). Finally, to assess the impact of dimerization on protein stability, we constructed a double mutant LIMK2a-P386E-Y630F in order to disrupt the interaction between LIMK2a-Y630F and Hsp90, the protein involved in LIMK dimerization. We then performed our cycloheximide chase assay. In our experiment, LIMK2a-P386E-Y630F mutant display a profile similar to that of LIMK2a-Y630A. It decreases rapidly upon addition of cycloheximide in the medium, the signal dropping under 50% after 2 hours of treatment (**Figure 7C**).

Altogether, our results show that Y630 is involved in LIMK2a dimerization, and subsequent transphosphorylation, which triggers its stability.

Finally, we studied if there was a possible link between LIMK2 dimerization/transphosphorylation and T505 phosphorylation. We constructed a double mutant bearing P386E and Y630F mutations. We then checked its activity on cofilin in our in vitro assay. LIMK2a-P386E-Y630F did not phosphorylate cofilin, neither did LIMK2a-P386E mutant, indicating that dimerization play a crucial role in LIMK2a activation and activity (**Figure 8A**).

We then assessed T505 phosphorylation of these mutants by western-blot. We showed that neither LIMK2a-P386E-Y630F nor LIMK2a-P386E were phosphorylated on their T505 (**Figure 8B**). We conclude that phosphorylation on T505 is linked to LIMK2a ability to dimerize and transphosphorylate and that dimerization is a necessary, preliminary step to LIMK2a phosphorylation on T505 and subsequent activation.

Discussion

LIMK implication in the development of several pathologies, especially cancer, have been studied thoroughly. LIMK2 in particular was described as a major target for anticancer therapies, as it has been shown to be dysregulated in breast cancer, prostate cancer, osteosarcoma and glioblastoma. Three isoforms of human LIMK2 are described in the literature: LIMK2a, LIMK2b, and LIMK2-1. Most studies have focused on LIMK2a and, to a lesser extent, LIMK2b and LIMK2-1. Hominidae-specific isoform LIMK2-1 differs from its counterparts by the presence of an extra C-terminal domain identified as a Protein Phosphatase 1 inhibitory (PP1i) domain by sequence homology. Moreover, while this isoform lacks of kinase activity on cofilin, it participates in the upkeep of phosphorylated cofilin pool by preventing its dephosphorylation by Protein Phosphatase 1. LIMK2-1 is an exception when compared to other LIM kinases, and the proof that we are still missing some evidences on the molecular determinants required for LIMK activity on their substrate. Here, we wanted to go further into the molecular mechanisms regulating LIMK2 activity on cofilin.

First, we assessed the importance of the C-terminal extremity of the protein in its activity on cofilin. We studied truncated C-terminal mutants of LIMK2a of various lengths, paying attention to the structural specificity of those truncations. Interestingly, none of them was able to phosphorylate cofilin indicating that C-terminal extremity between residues 612 and 638 plays a role in the activity of LIMK2a on cofilin. As those mutants were no longer phosphorylated, we hypothesized that this portion of the C-terminal end could actually play a role in LIMK2a phosphorylation, activation and subsequent activity on cofilin.

We then hypothesized that the LIMK2a C-terminal portion between residue 612 and 638 could bear a phosphorylation site necessary for its activity on cofilin. Five residues were selected as potential phosphorylation sites: threonine 625, serine 627, tyrosine 630, threonine 633, and serine 636. We mutated each one of those residues in alanine, a non-phosphorylatable residue, by site-directed mutagenesis. We identified one amino acid, tyrosine 630, which appears to be crucial for the kinase activity on cofilin. When this amino acid is mutated to alanine, cofilin phosphorylation is lost. Yet, the kinase domain of this mutant appears to be functional, since it is capable of phosphorylating a universal kinase substrate, MBP. Moreover, Y630A mutation, also impact the phosphorylation of the protein. LIMK2 overexpression in cell lines induces actin polymerization and stress fibers appearance within the cytoplasm. We showed that LIMK2a-Y630A mutant was not able to

generate stress fibers, as opposed to WT LIMK2a, confirming the kinase assays results. Finally, we constructed a LIMK1-Y632A mutant, homologue to LIMK2a-Y630A mutant, to see if tyrosine 630 could be as important in LIMK1 as it seemed to be in LIMK2. This mutant behaved the exact same way as LIMK2a-Y630A. Finally, using ConSurf-DB, a bioinformatics tool that estimates the evolutionary conservation of amino acid positions in a protein molecule based on the phylogenetic relations between homologous sequences, we demonstrated that this tyrosine is well-conserved through evolution, confirming that this residue could play a crucial role in LIMK activity. Taken together, those results suggest that the loss of activity of LIMK2a-Y630A appears to be specific to cofilin, and not the result of a kinase function loss, and supports the idea that there is a phosphorylation site at the C-terminus, possibly at tyrosine 630, which is necessary for the activation of the protein and its subsequent activity on cofilin.

We then further molecularly characterized LIMK2a-Y630A. This mutant still interacts with its specific substrate cofilin and with one of its upstream activators, ROCK, but to our surprise, it is no longer phosphorylated on threonine 505, the canonical site of activation of LIM kinases, as described in the literature. We formulated the hypothesis that phosphorylation on tyrosine 630 was a preliminary step to T505 phosphorylation. We took advantage of the mutant LIMK2a-T505EE, which mimics ROCK activation on the T505 and is therefore constitutively active, to determine whether a prior event mediated by tyrosine 630 was necessary for the activation of LIMK2 on T505 and therefore for its activity on its substrate. We constructed a double mutant that is both constitutively active (LIMK2a-T505EE), therefore allowing to bypass T505 activation, and carrying the Y630A mutation and assessed its activity on cofilin. To our surprise, LIMK2a-T505EE-Y630A was still unable to phosphorylate cofilin. Taken together, the results suggest that T505 phosphorylation by upstream kinases, such as ROCK, is not sufficient to allow optimal activity on cofilin. Tyrosine 630 plays crucial a role in the activation of protein, independently of T505 phosphorylation.

LIM kinases can adopt two forms depending of their state of activation. When activated, LIMKs adopt the “DFG-in” conformation, indicating that their activation loop, typically 20 to 30 residues in length beginning with a conserved DFG motif (usually Asp-Phe-Gly), is buried in a hydrophobic pocket in the back of the ATP-binding site. This allows the positioning of the ATP phosphate and subsequent substrate phosphorylation. In “DFG-out form”, the activation loop is out of its hydrophobic pocket and in the active site, which

impairs ATP phosphate positioning and substrate phosphorylation. The analysis of several LIMK2a crystallography structures suggested that tyrosine 630 could be linked to the activated form of the protein, as it can adopt two different conformations, interior/exterior, linked to the DFG-out/DFG-in forms of the protein. In order to better understand the molecular role of this tyrosine 630 within the structure of LIMK2a, we mutated tyrosine 630 into phenylalanine, much closer to tyrosine from a structural point of view. We also constructed two phosphomimetic mutants of the tyrosine 630. LIMK2a-Y630S, in which tyrosine is replaced by serine, another phosphorylatable amino acid, and LIMK2a-Y630E, as glutamic acid can mimic the phosphorylation state of a residue. LIMK2a-Y630S and LIMK2a-Y630E mutants were not able to restore cofilin phosphorylation, nor LIMK phosphorylation. However, to our surprise, the LIMK2a-Y630F completely restored cofilin phosphorylation and phosphorylation of the mutant itself, on T505 and more generally on the whole protein. Those results indicate that tyrosine 630 might, in fact, play a role in the structure and dynamics of the protein, and its phosphorylation, rather than serve as a phosphorylation site.

We then wanted to assess which kind of phosphorylation was mediated by tyrosine 630. Our hypothesis were that Y630 could be the anchorage point of another protein phosphorylating LIMK, or that it could play a role in LIMK ability to self-phosphorylate. Indeed, Li et al. demonstrated that LIM kinases are capable of forming hetero- and homodimers, with this assistance of the Hsp90 protein, and to transphosphorylate on sites that are yet to be found. This dimerization leads to the increase of the stability of LIMK and, therefore, the increase of their activity. We constructed two more mutants to answer this question. One the mutant, LIMK2a-P386E, impairs LIMK ability to dimerize since Proline 386 is the anchorage point of the chaperone Hsp90. The other mutant, LIMK2a-D451N, is a well-described kinase-dead (KD) mutant. KD mutant was not phosphorylated, nor able to phosphorylate cofilin, indicating that LIMK cannot be phosphorylated at all if their kinase activity is impaired. This led us to think that some self-phosphorylation event takes place before any other kind of phosphorylation, including those happening on T505. Hence, it was not another kinase that was responsible for Y630-mediated LIMK2a phosphorylation. Interestingly, LIMK2a-P386E mutant was also not phosphorylated, nor able to phosphorylate cofilin. Taken together, those results indicate that tyrosine 630 mediates LIMK dimerization and subsequent phosphorylation.

To confirm those results, we studied the ability of the mutants LIMK2a-Y630A and LIMK2a-Y630F to dimerize, as well as their stability. The results indicate that LIMK2a-

Y630A is indeed unable to dimerization, while LIMK2a-Y630F is. Furthermore, the LIMK2a-Y630A mutant is less stable than the WT protein. Conversely, the LIMK2a-Y630F mutant exhibits stability similar to that of the WT. I then studied the stability of a LIMK2a-P386E-Y630F mutant unable to dimerize and the results indicate that its stability is equivalent to that of the LIMK2a-Y630A mutant, i.e. approximately 4 hours. These results reinforce the idea that the Y630A mutation impact the capacity of LIMK2a to dimerize and transphosphorylate, thus decreasing its stability as well as its activity on cofilin. Finally, we wanted to assess how dimerization could impact phosphorylation of T505. We showed that the LIMK2a-P386E-Y630F mutant was not phosphorylated on T505, indicating that the dimerization and transphosphorylation of LIM kinases is a crucial phenomenon that occurs before their activation by upstream kinases on T505.

Here, we have characterized a new mechanism of LIM kinases activity regulation. First of all, we showed that phosphorylation of Thr505 activation site was not sufficient to allow optimal cofilin phosphorylation. Indeed, LIMK dimerization and transphosphorylation are absolutely necessary for T505 phosphorylation to occur. We still need to assess the exact role of Y630 in the succession of those events. Tyrosine 630 could act as an anchorage point for LIMK dimerization, by allowing LIMK-LIMK interaction directly, or LIMK-chaperone-protein LIMK. Moreover, we showed that this mechanism is probably cofilin-specific, since tyrosine 630 mutation did not impact protein ability to phosphorylate other substrates, which is really interesting knowing that LIMK are the heart of a very large protein-protein interaction network. Our work then ought to provide a better understanding of the remodelling of actin cytoskeleton by the regulation of LIMK activity on cofilin, providing new elements for the development of future therapies.

La discussion présentée au sein de l'article est une version préliminaire. Les résultats obtenus en modélisation par notre collaboratrice Samia Aci-Sèche, les dernières publications sur l'autorégulation des LIMKs et le recul acquis lors de la rédaction de la discussion et des perspectives de ce manuscrit constituent une conclusion bien plus intéressante à cette étude moléculaire.

Figures

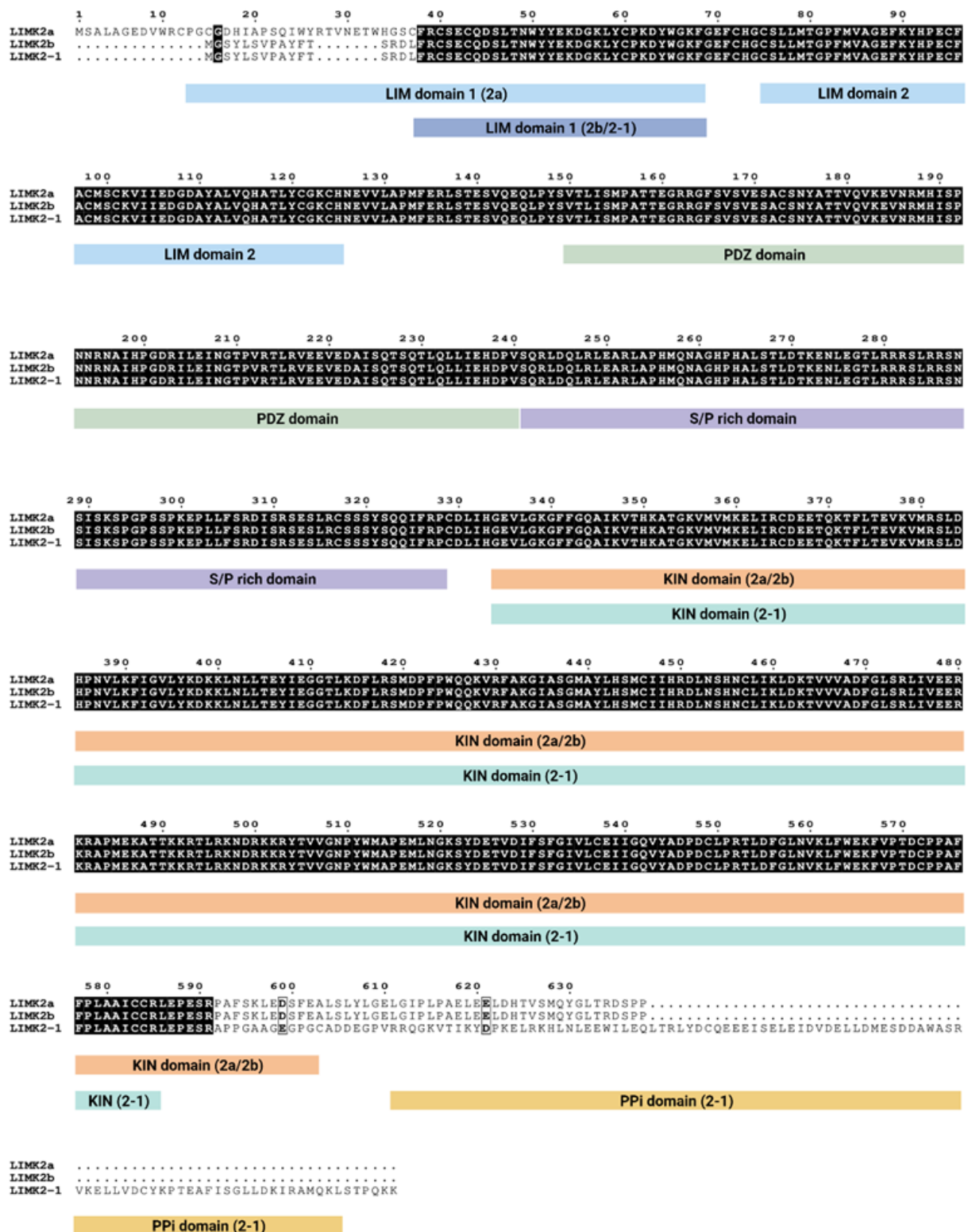
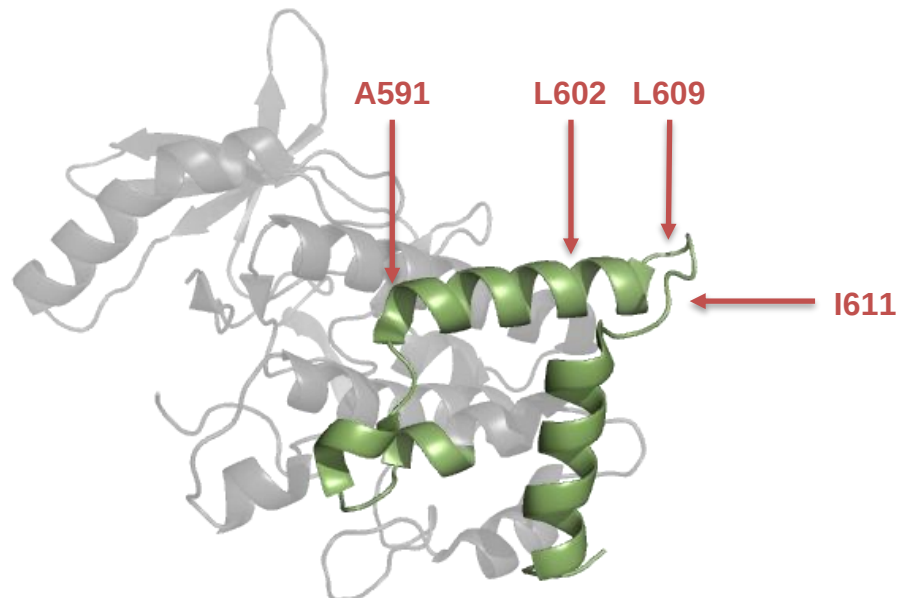
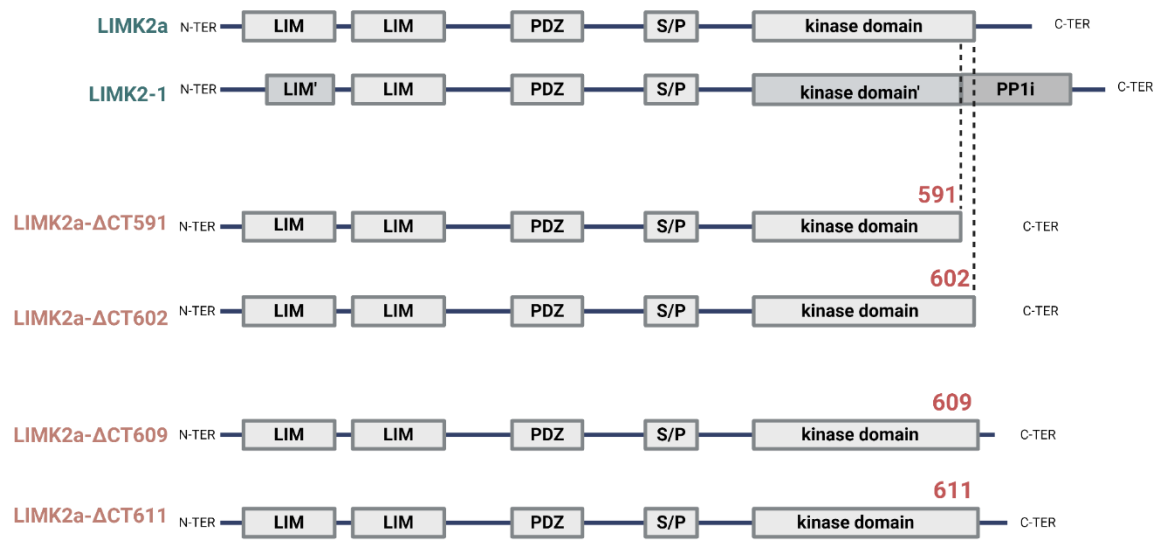


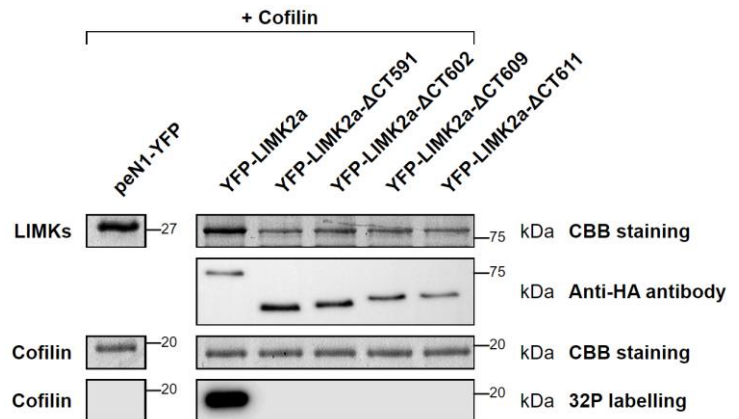
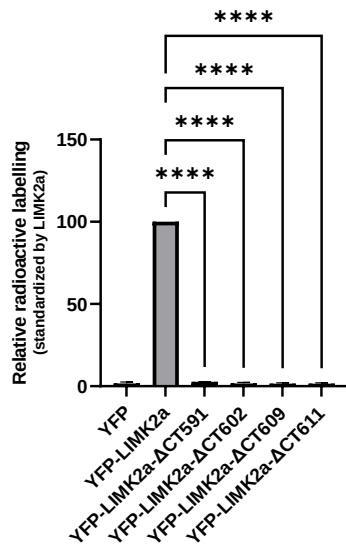
Figure 1: LIMK2 isoforms alignment, major differences between LIMK2a, 2b and 2-1 lie at their extremities.

Sequence alignment and domain representation of the three isoforms of human LIMK2. LIMK2 isoforms are described in Entrez Gene: LIMK2-1 (NP_001026971.1), LIMK2a (NP_005560.1), LIMK2b (NP_057952.1). The various domains of LIMK2 are shown: LIM, PDZ, S/P rich (Serine Proline rich), KIN (Kinase), and PPIi (Protein Phosphatase 1 inhibitory).

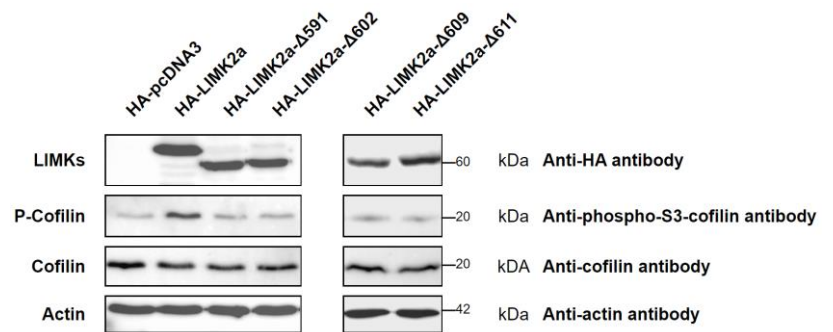
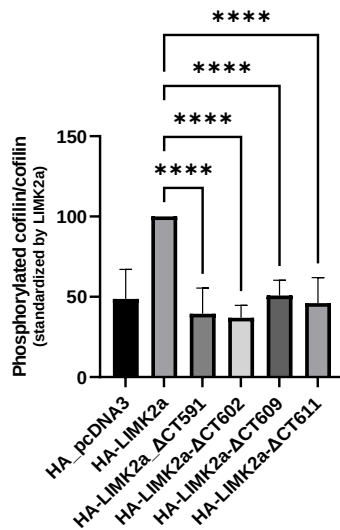
A)



B) *In vitro* phosphorylation of cofilin



C) *In cellulo* phosphorylation of cofilin



D) *In vitro* phosphorylation of LIMK

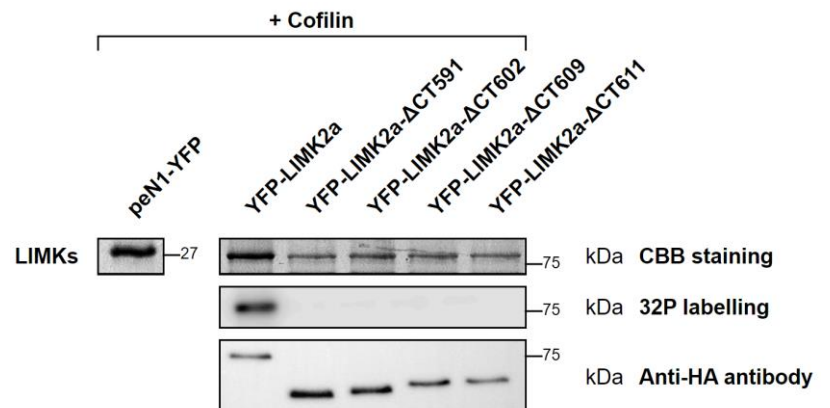
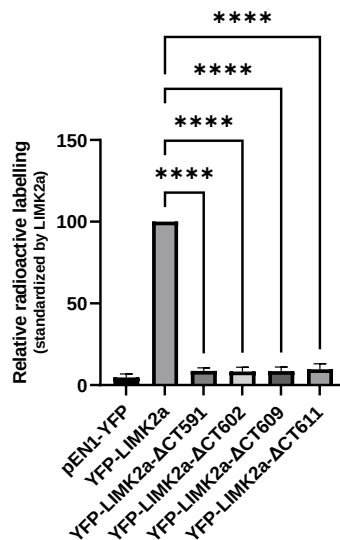
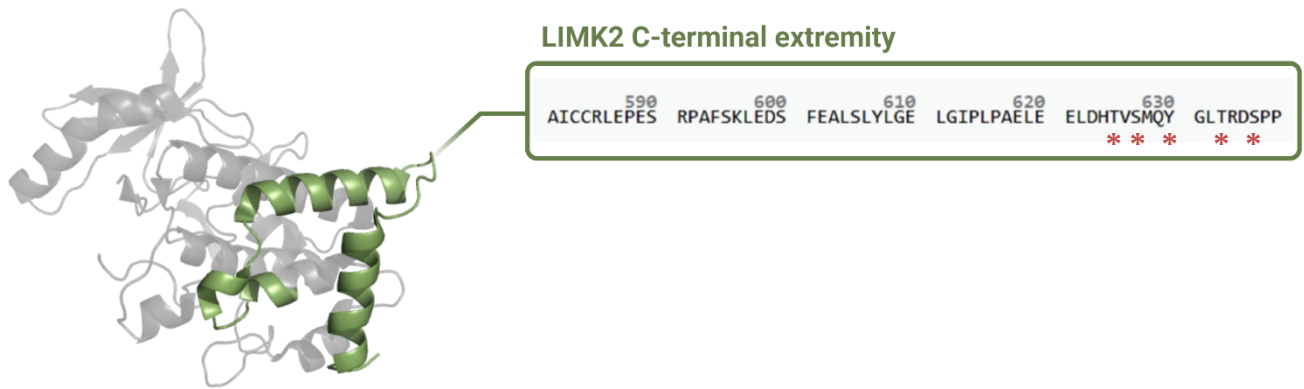


Figure 2: The C-terminal extremity of LIMK2 is required for its kinase activity on cofilin and its own phosphorylation.

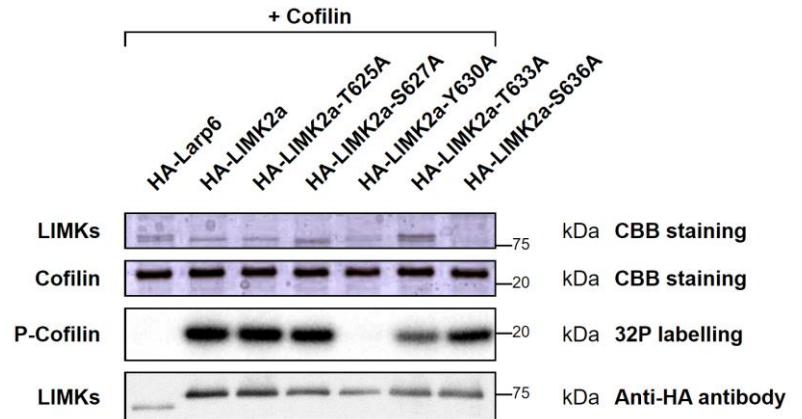
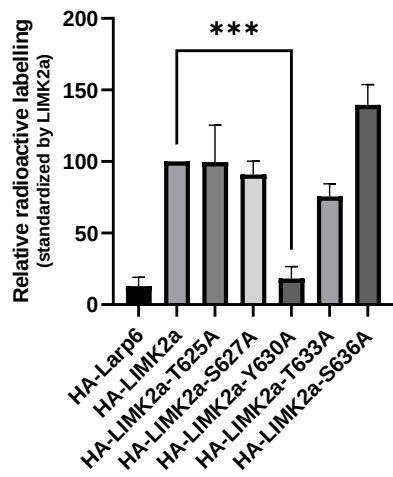
A) Schematic diagram and 3D structure of C-terminal truncated LIMK2 constructions (PDB structure 4TPT). B) *C-terminal truncated mutants of LIMK2a does not phosphorylate cofilin in vitro*. HEK-293 cells were transfected with one of the four YFP-tagged LIMK2a truncated mutants (Δ CT591, Δ CT602, Δ CT609, Δ CT611) or YFP as a negative control. Anti-YFP immunoprecipitated proteins and 6xhis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-YFP immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT transfected cells was normalized to 100. C) *C-terminal truncated mutants of LIMK2a does not phosphorylate cofilin in cellulo*. HEK-293 cells were transfected with one of the four HA-tagged LIMK2a truncated mutants (Δ CT591, Δ CT602, Δ CT609, Δ CT611) or pcDNA3 as a negative control. Lysates were subjected to western blotting. Quantification of the ratio of phospho-cofilin versus cofilin is shown in the left graph. Phospho-cofilin vs cofilin ratio of WT transfected cells was normalized to 100. D) *C-terminal truncated mutants of LIMK2a are not phosphorylated in vitro*. HEK-293 cells were transfected with one of the four YFP-tagged LIMK2a truncated mutants (Δ CT591, Δ CT602, Δ CT609, Δ CT611) or YFP as a negative control. Anti-YFP immunoprecipitated proteins and 6xhis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-YFP immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative LIMK phosphorylation is shown in the left graph. Relative LIMK phosphorylation of WT transfected cells was normalized to 100.

A)



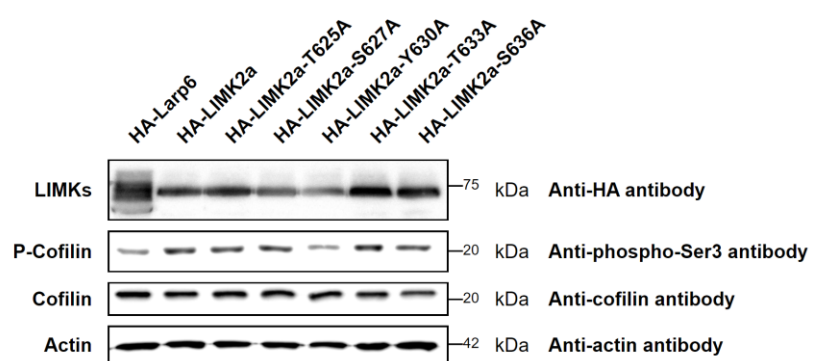
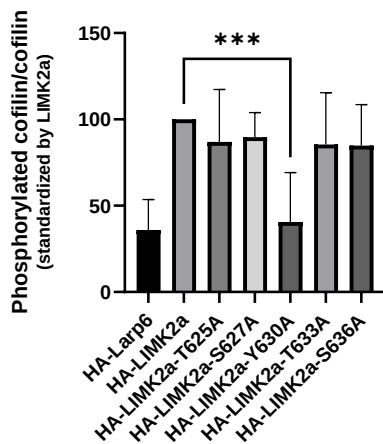
B)

In vitro phosphorylation of cofilin

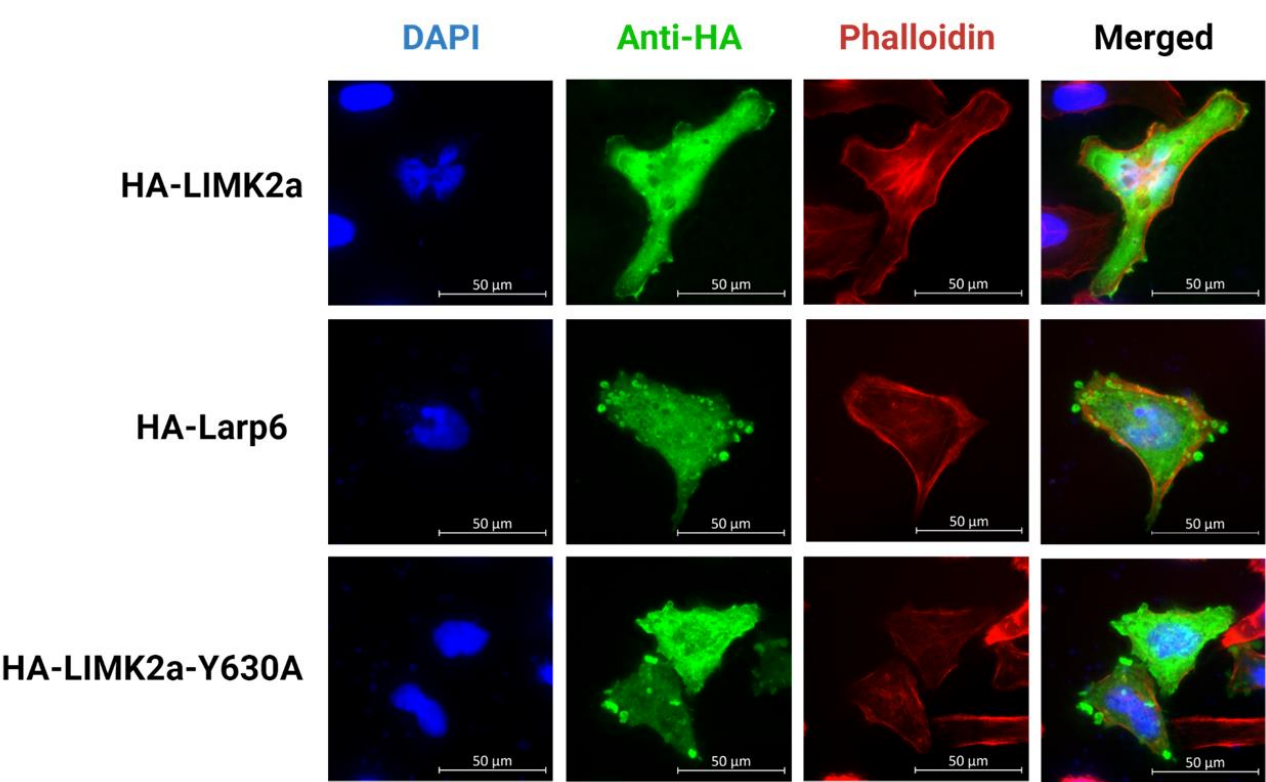


C)

In cellulo phosphorylation of cofilin

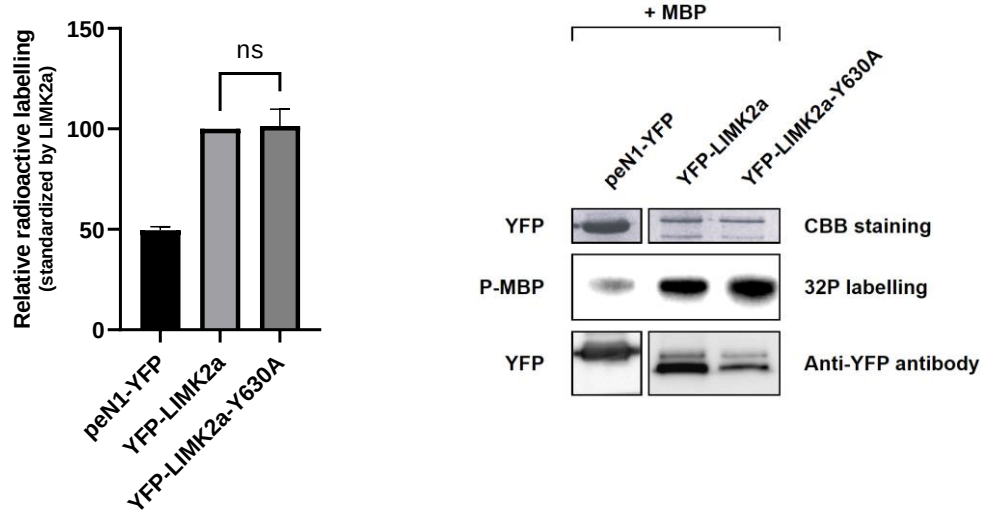


D)

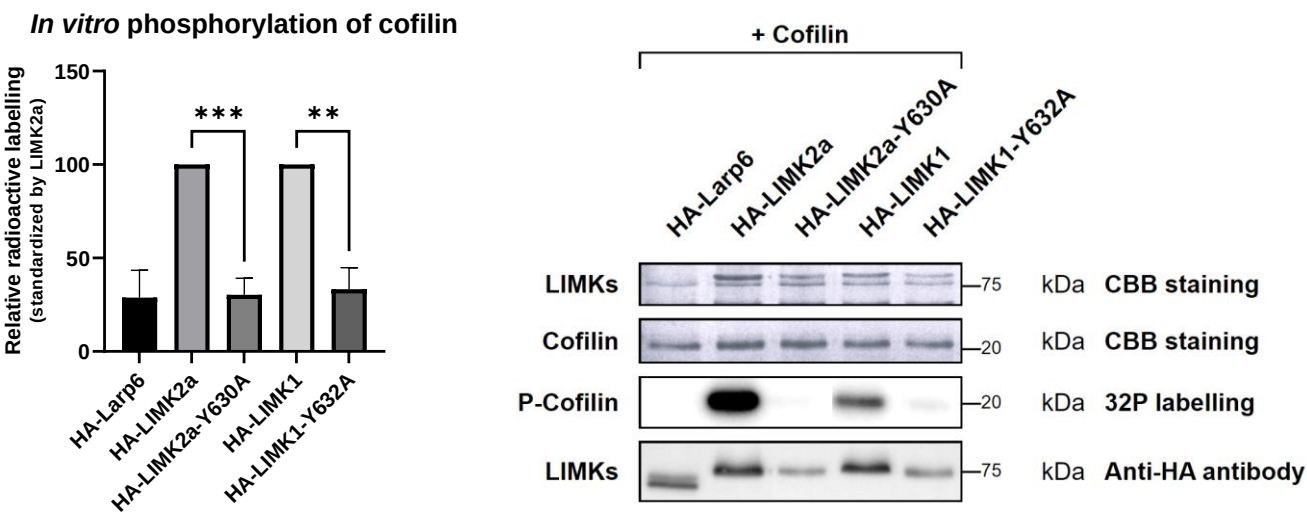


E)

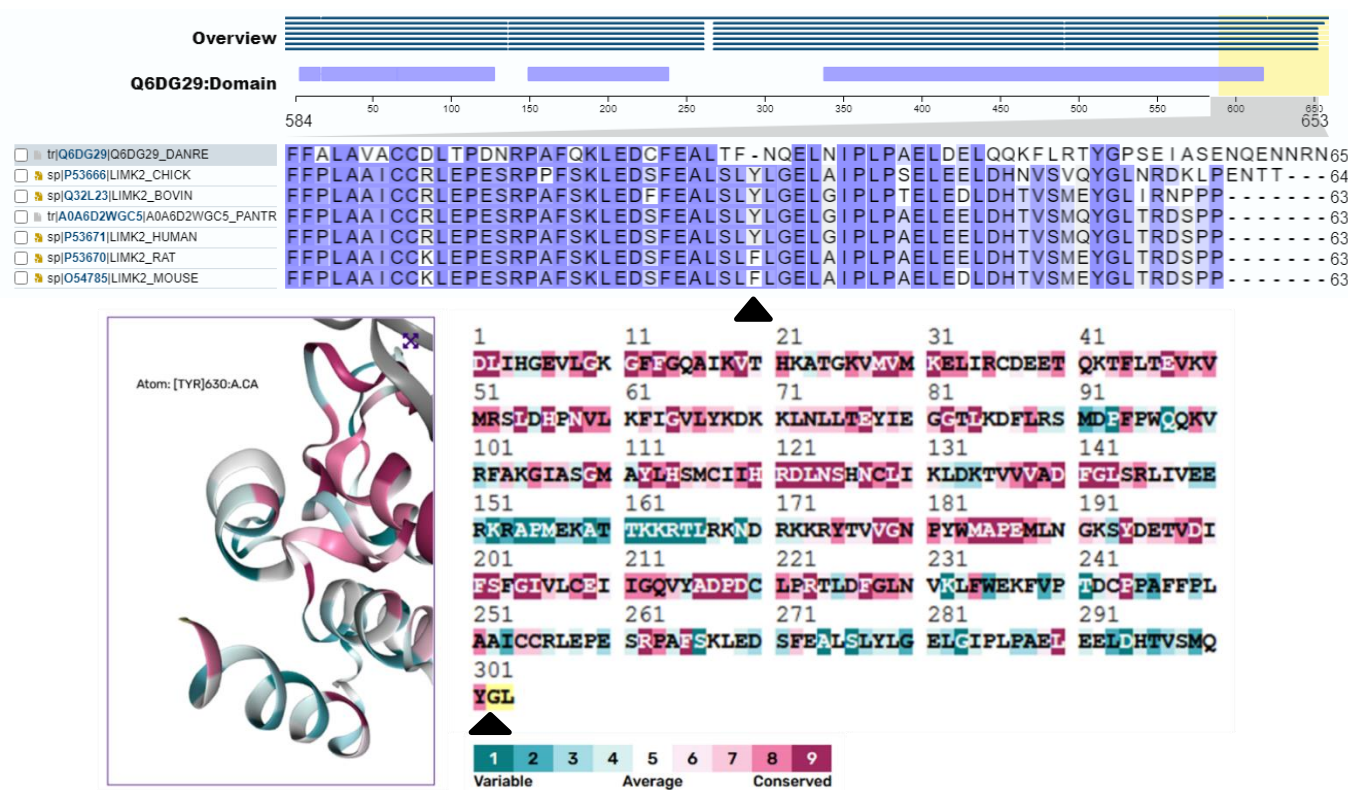
In vitro phosphorylation of MBP



F)



G)



H)

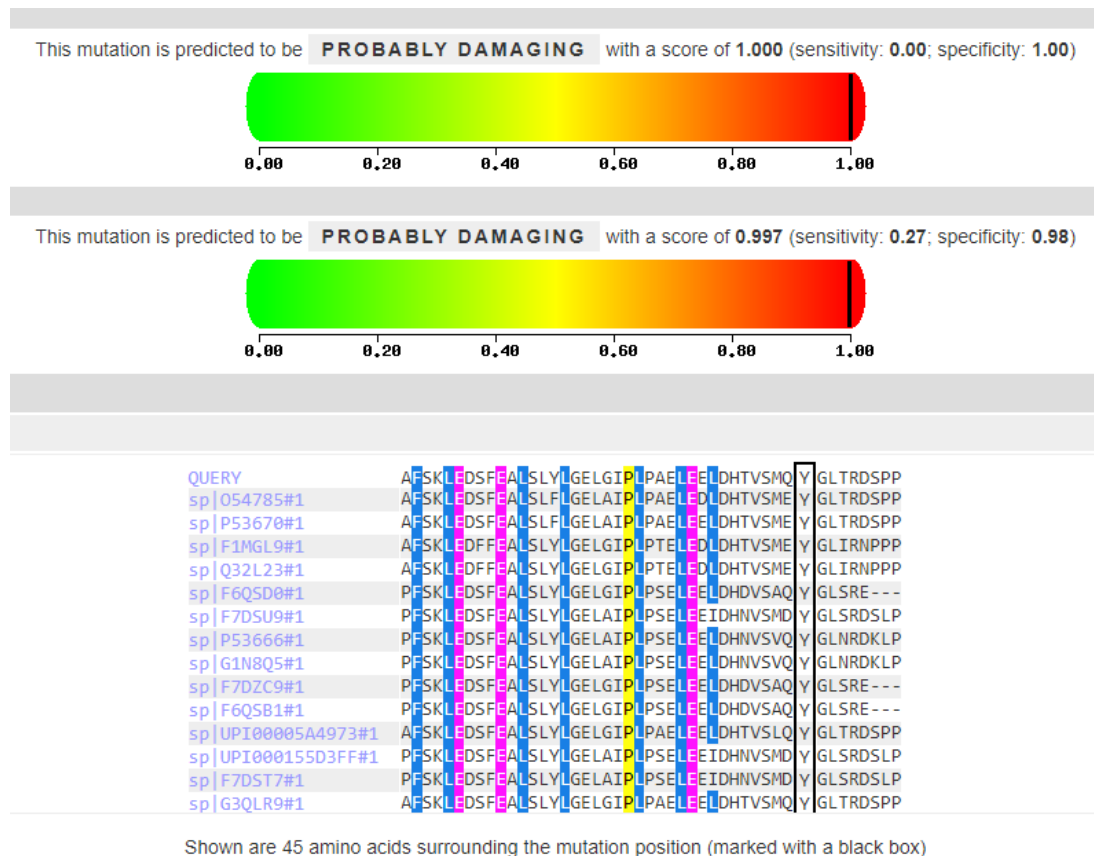


Figure 3: LIMK2a-Y630A mutant does not phosphorylate cofilin.

A) Sequence of the C-terminal extremity of LIMK2a. Potential phosphorylated amino-acids corresponding to site-directed mutants are indicated by an arrow: T625, S627, T630, T633 and S636. B) *LIMK2a-Y630A does not phosphorylate cofilin in vitro*.

HEK-293 cells were transfected with one of the seven HA-tagged LIMK2a point mutants (T625A, S627A, Y630A, T633A, or S636A) or an unrelated HA-tagged protein, Lar6, as a negative control. Anti-HA immunoprecipitated proteins and 6xHis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-HA immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. C) *LIMK2a-Y630A does not phosphorylate cofilin in cellulo*. HEK-293 cells were transfected with one of the seven HA-tagged LIMK2a mutants (T625A, S627A, Y630A, T633A, or S636A) or an unrelated HA-tagged protein, Lar6, as a negative control. Lysates were subjected to western blotting. Quantification of the ratio of phospho-cofilin versus cofilin is shown in the left graph. Phospho-cofilin vs cofilin ratio of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. D) *LIMK2a-Y630A is unable to induce stress fibers*. HeLa cells were transfected with HA-tagged WT LIMK2a and mutant LIMK2a-Y630A. HA-tagged Lar6 was used as a negative control. Cells were fixed and actin cytoskeleton was stained using phalloidin. Anti-HA antibody was used to show transfected cells. The scale bar represents 50 μ m. E) *LIMK2a-Y630A is able to phosphorylate MBP in vitro*. HEK-293 cells were transfected with YFP-tagged WT LIMK2a or mutant LIMK2a-Y630A. Plasmid peN1-YFP was used as a negative control. Anti-YFP immunoprecipitated proteins and commercial purified MBP were used in the kinase assay. The anti-YFP immunoprecipitates were also subjected to anti-YFP immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. F) *LIMK1-Y632A does not phosphorylate cofilin in vitro either*. HEK-293 cells were transfected with HA-tagged WT LIMK2a and LIMK1, and mutants LIMK2a-Y630A and LIMK1-Y632A. HA-tagged protein Lar6 was used as a negative control. Anti-HA immunoprecipitated proteins and 6xHis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-HA

immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a or WT LIMK1 transfected cells was normalized to 100. G) *Tyrosine 630 is highly conserved in LIMK2a*. Up panel: Alignments of protein sequences of the C-terminal extremity of LIMK2a in different species: Homo sapiens (P53671), Rattus norvegicus (P53670), Mus musculus (O54785), Pan troglodytes (A0A6D2WGC5), Bos taurus (Q32L23), Gallus gallus domesticus (P53666), Danio rerio (Q6DG29). Tyr630 is indicated by a black arrowhead. Down panel: Evolutionary rate of each amino acid position in LIMK2 protein using ConSurf Data Base on PDB 4TPT. Tyr630 is indicated by a black arrowhead. H) *Analysis of Y630A mutation by bioinformatics tools predicts highly damaged protein*. Predictive effects of the mutation were evaluated using two different bioinformatics tools: Polyphen2 (up panel) and MutationTaster (down panel).

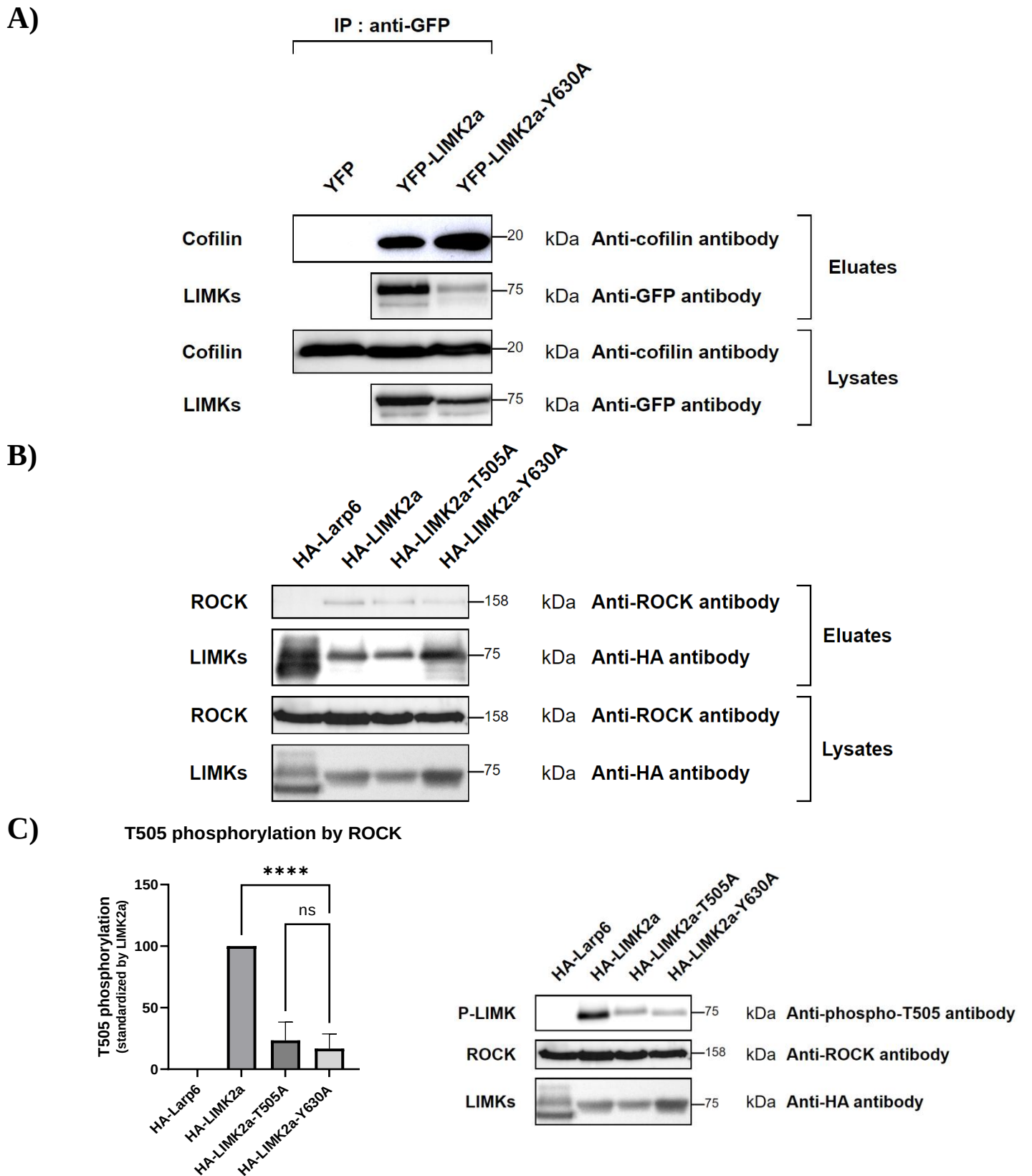
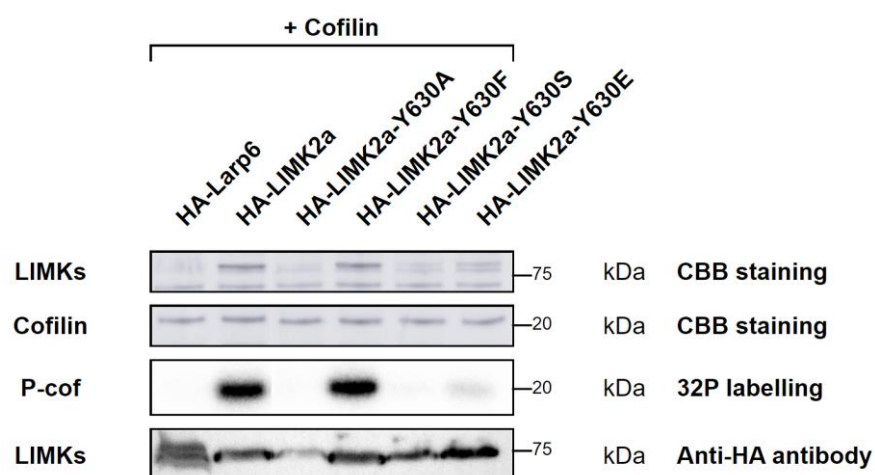
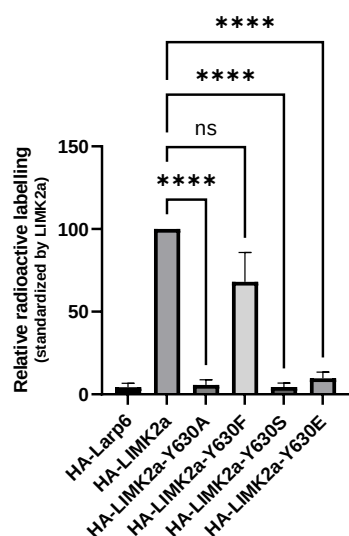


Figure 4: LIMK2a-Y630A mutant downstream and upstream partners.

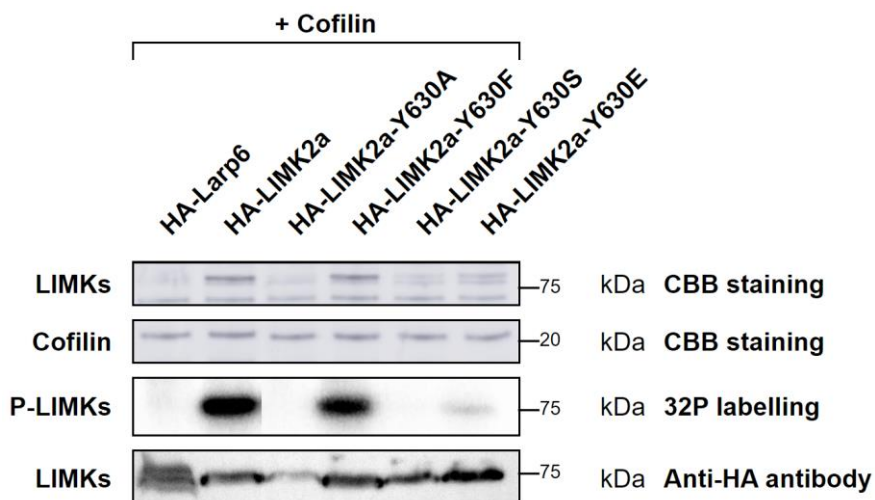
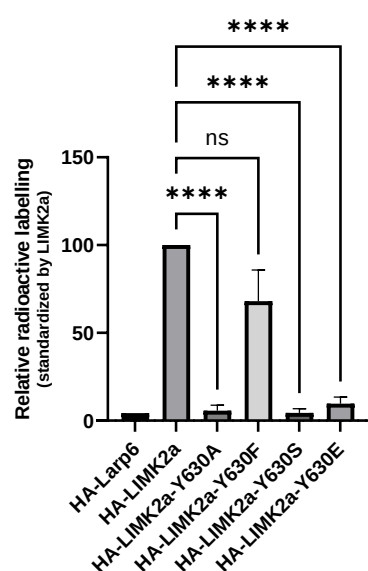
A) *LIMK2a-Y630A* is able to interact with endogen cofilin. HEK-293 cells were transfected with YFP-tagged WT LIMK2a, or mutant LIMK2a-Y630A. YFP-peN1 was used as a negative control. Lysates and anti-YFP immunoprecipitates were subjected to western blotting. B) *LIMK2a-Y630A* is able to interact with the upstream kinase ROCK. HEK-293 cells were co-transfected with HA-tagged LIMKs (WT

LIMK2a, LIMK2a-Y630A or LIMK2a-T505A) and cMyc-tagged ROCK. HA-tagged Larp6 was used as a negative control. Lysates and anti-HA immunoprecipitates were subjected to western blotting. C) *LIMK2a-Y630A is not phosphorylated by ROCK on T505*. HEK-293 cells were co-transfected with HA-tagged LIMKs (WT LIMK2a, LIMK2a-Y630A or LIMK2a-T505A) and cMyc-tagged ROCK. HA-tagged Larp6 was used as a negative control. Lysates were subjected to western blotting.

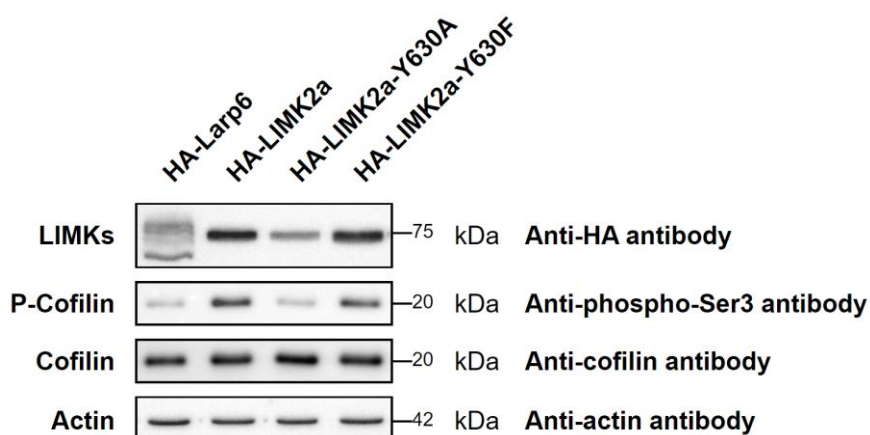
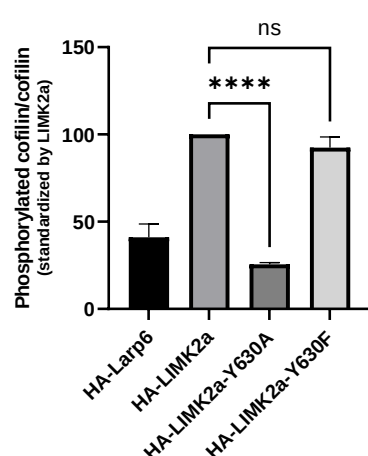
A) *In vitro* phosphorylation of cofilin



B) *In vitro* phosphorylation of LIMK



C) *In cellulo* phosphorylation of cofilin



D) T505 phosphorylation by upstream kinases

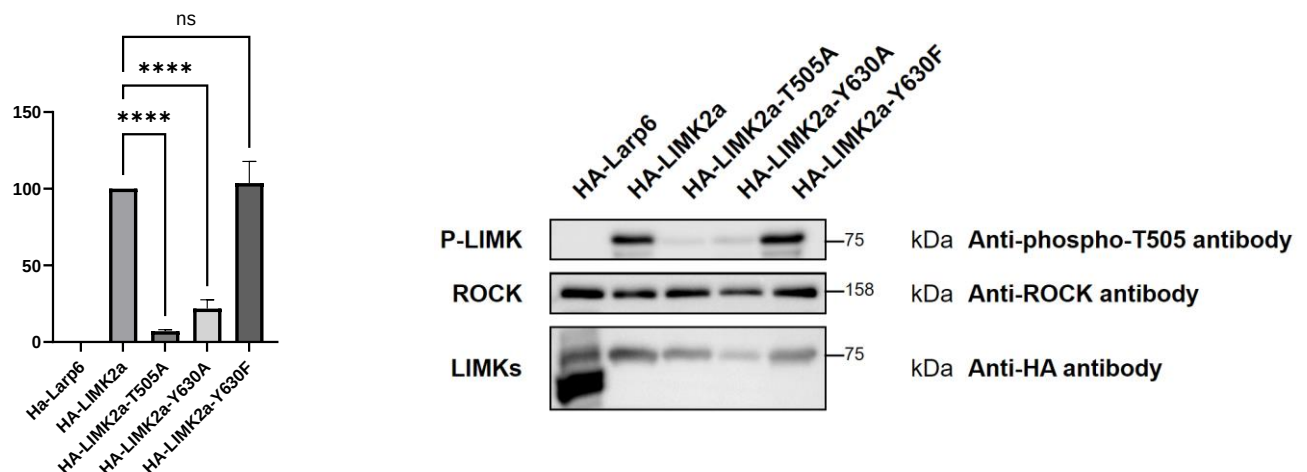
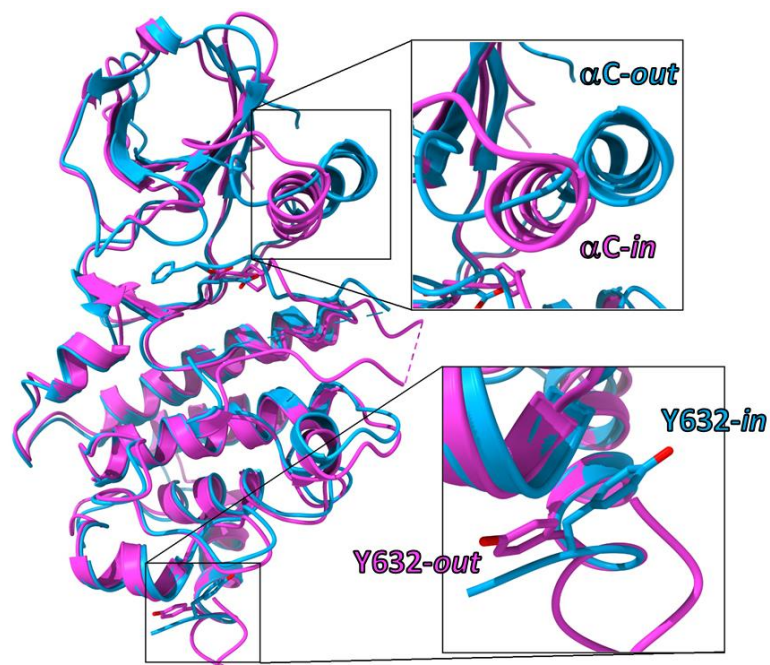


Figure 5: Which process is mediated by tyrosine 630?

A) *LIMK2a-Y630F* restores cofilin phosphorylation *in vitro*. HEK-293 cells were transfected with one of the four HA-tagged LIMK2a mutants (Y630A, Y630F, Y630S, or Y630E) or an unrelated HA-tagged protein, Larp6, as a negative control. Anti-HA immunoprecipitated proteins and 6xHis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-HA immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. B) *LIMK2a-Y630F* is phosphorylated *in vitro*. HEK-293 cells were transfected with one of the four HA-tagged LIMK2a mutants (Y630A, Y630F, Y630S, or Y630E) or an unrelated HA-tagged protein, Larp6, as a negative control. Anti-HA immunoprecipitated proteins and 6xHis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-HA immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. C) *LIMK2a-Y630F* phosphorylates cofilin *in vitro*. HEK-293 cells were transfected with one of the four HA-tagged LIMK2a mutants (Y630A, Y630F, Y630S, Y630E) or an unrelated HA-tagged protein, Larp6, as a negative control. Lysates were subjected to western blotting. Quantification of the ratio of phospho-cofilin versus cofilin is shown in the left graph. Phospho-cofilin vs cofilin ratio of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. D) *LIMK2a-Y630A* is not phosphorylated by ROCK on T505. HEK-293 cells were co-transfected with one of the four HA-tagged LIMK2a mutants (Y630A, Y630F, Y630S, or Y630E) and cMyc-tagged ROCK. HA-tagged Larp6 was used as a negative control. Lysates were subjected to western blotting. Quantification of the ratio of phospho-LIMK versus lysates is shown in the left graph. phospho-LIMK versus lysates ratio of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100.

A)



PDB.ID	DFG	α C helix	Y630/630	Protein
5NXD	out	out	in	LIMK2
4TPT	out	out	in	LIMK2
7QHG	out	out	in	LIMK2
8WSW	in	out	in	LIMK2
8S3X	in	out	in	LIMK2
5NXC	in	out	in	LIMK1
7B8W	out	out	in	LIMK1
5HVK	in	in	out	LIMK1 ^{D460N}
3S95	in	in	out	LIMK1
5L6W	in	in	out	LIMK1
7ATU	out	out	in	LIMK1
5HVJ	in	in	in	LIMK1 ^{D460N}
7ATS	in	in	out	LIMK1
8AA	in	in	out	LIMK1

B) *In vitro* phosphorylation of cofilin

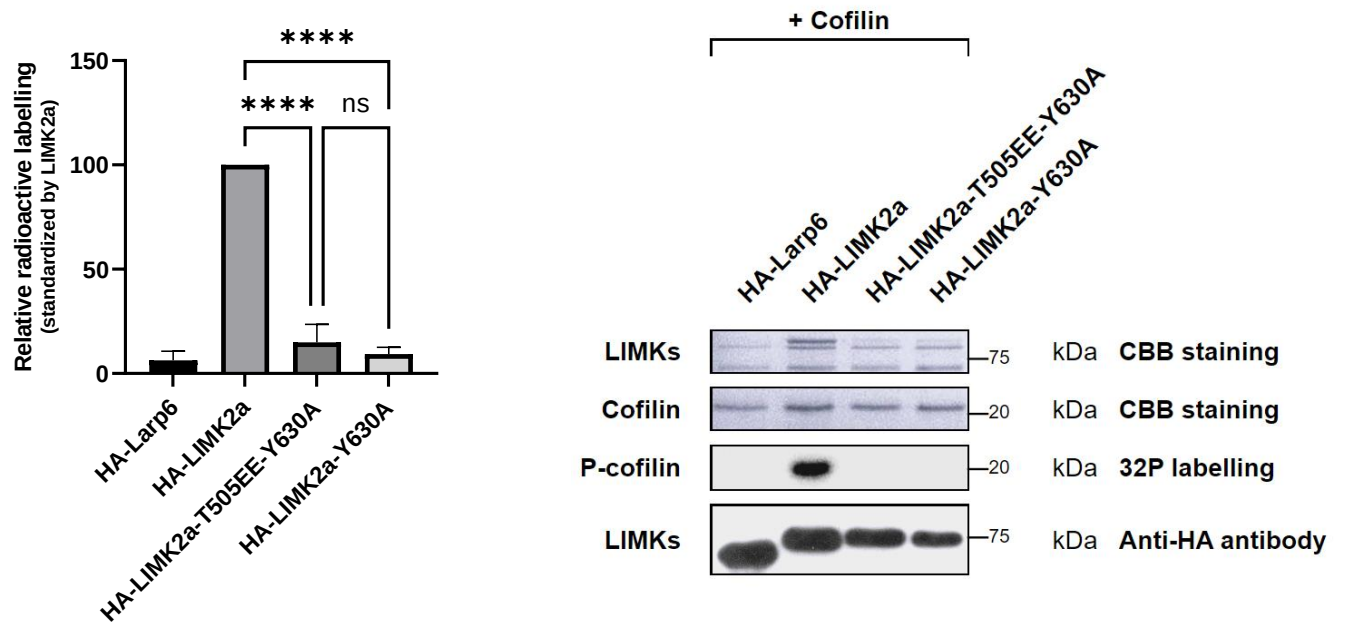
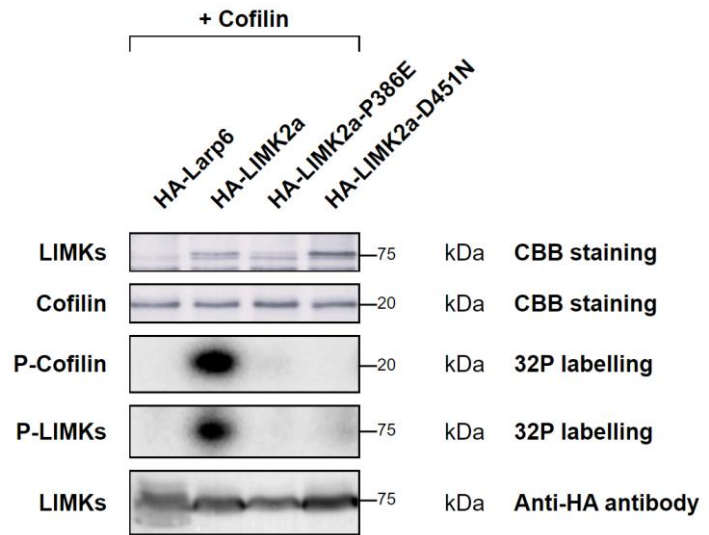
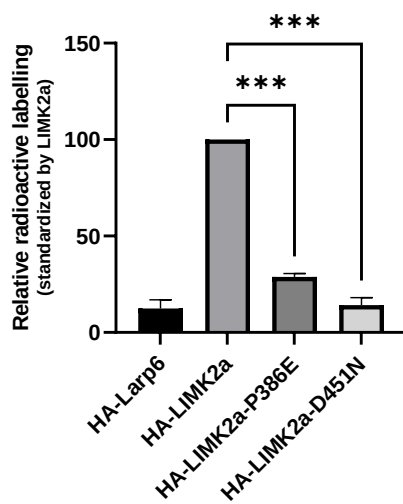


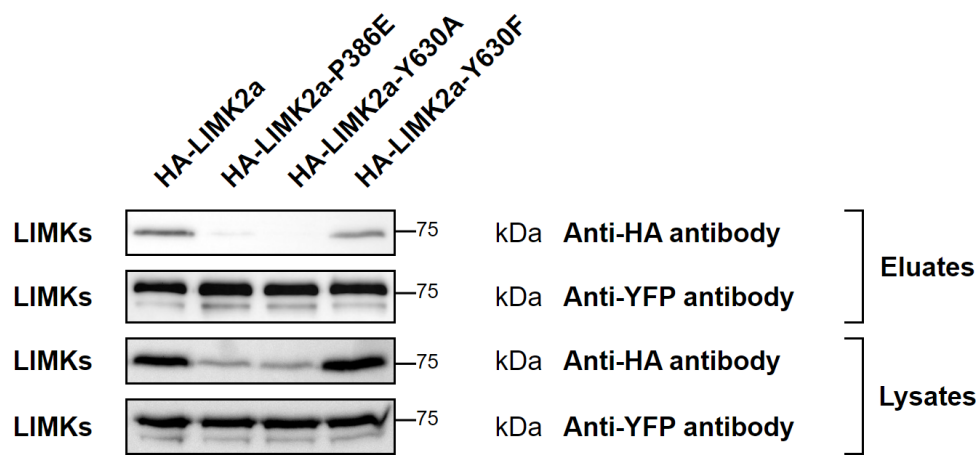
Figure 6: Tyrosine 632/630 conformation is correlated to LIMK1/LIMK2 activation state.

A) Y632/Y630 orientation is linked to α C-helix conformation in LIMK1/LIMK2 structures. Upper panel: superposition of 3D structures of LIMK1 kinase domain available in PDB (7b8w (blue) and 3s95 (pink)). Orientation of Y632 and α C-helix are zoomed in. Lower panel: comparison of tyrosine 632/630 and α C-helix orientations for all existing LIMK structures in PDB. B) *LIMK2a-T505EE-Y630A does not phosphorylate cofilin in vitro*. HEK-293 cells were transfected with HA-tagged WT LIMK2a, or mutants LIMK2a-Y630A or LIMK2a-T505EE-Y630A. HA-tagged Larp6 was used as a negative control. Anti-HA immunoprecipitated proteins and 6xHis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-HA immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100.

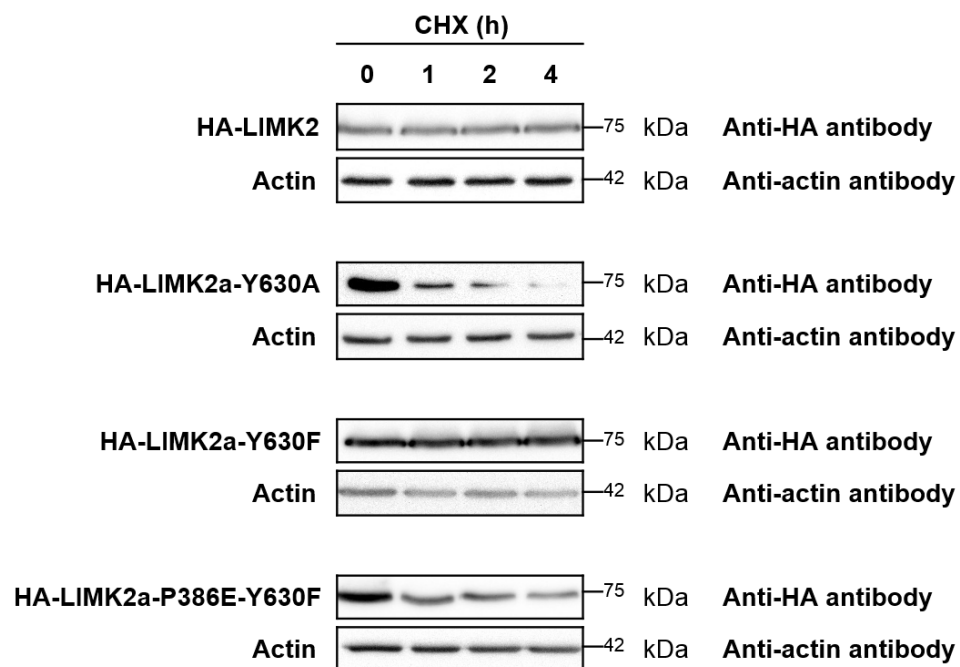
A) *In vitro* phosphorylation of cofilin



B)



C)



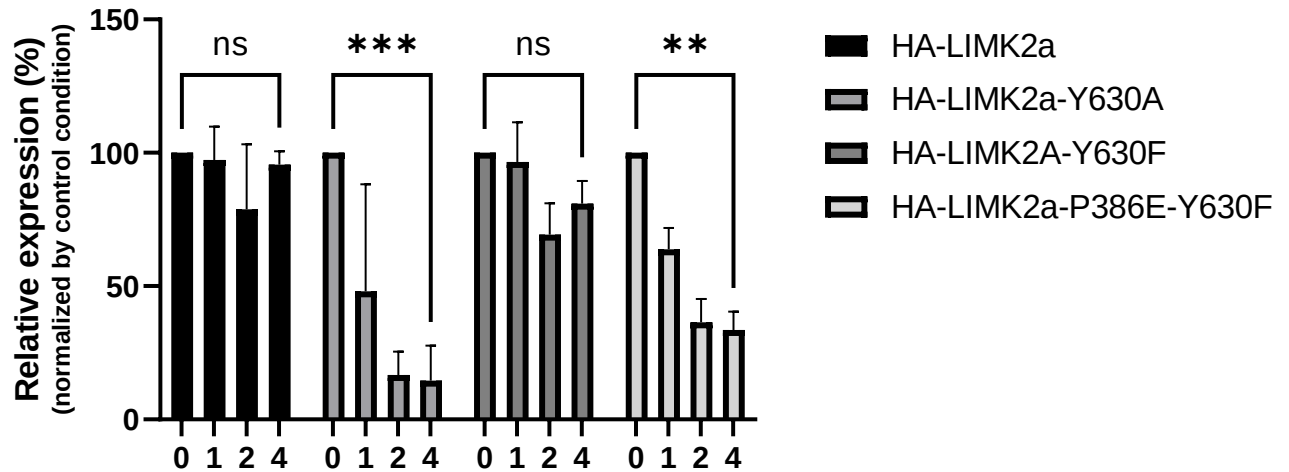
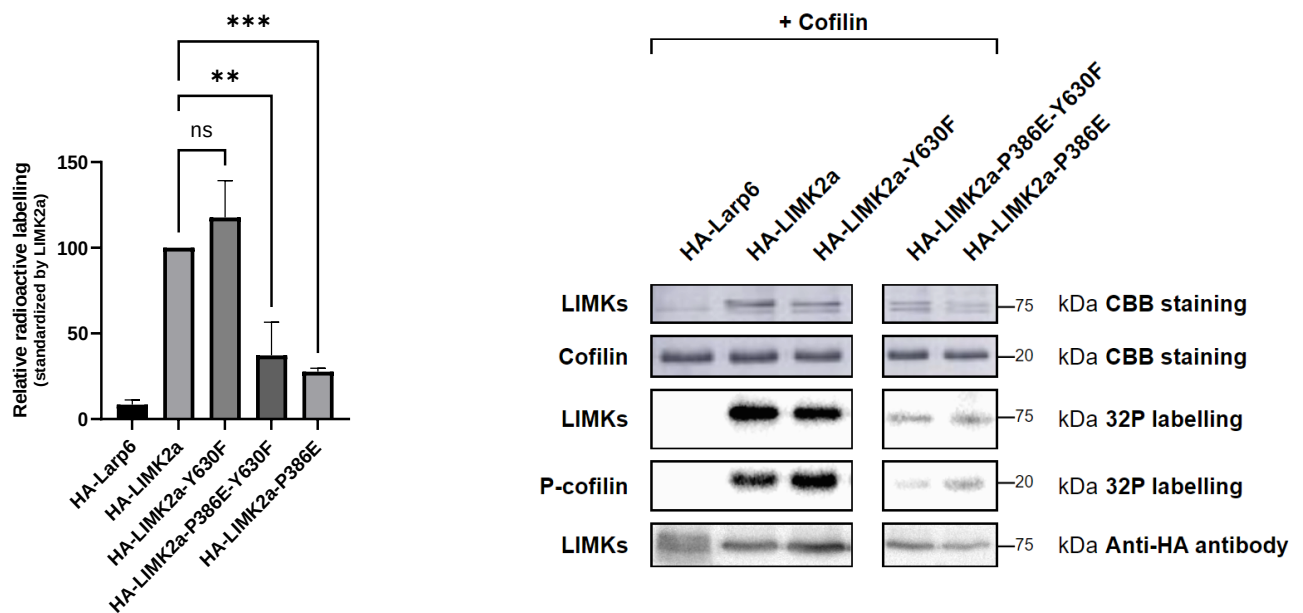


Figure 7: LIMK2 self-phosphorylation occurs by a transphosphorylation triggered by its dimerization.

A) *LIMK2 self-phosphorylation occurs by a transphosphorylation.* HEK-293 cells were transfected with HA-tagged WT LIMK2a, or mutants LIMK2a-P386E or LIMK2a-D451N. HA-tagged Larp6 was used as a negative control. Anti-HA immunoprecipitated proteins and 6xHis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-HA immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. B) *Y630 is involved in LIMK2 ability to dimerize.* HEK-293 cells were co-transfected with YFP WT LIMK2a and HA-tagged LIMK2a constructs (WT LIMK2a, LIMK2a-P386E, LIMK2a-Y630A or LIMK2a-Y630F). An immunoprecipitation with anti-GFP grafted beads was performed. Lysates and eluates were subjected to western blotting. C) *LIMK2a-Y630A and LIMK2a-P386E-Y630F mutants are less stable than WT.* HEK-293 cells were transfected with HA-tagged WT LIMK2a or mutants LIMK2a-Y630A, LIMK2a-Y630F and LIMK2a-P386E-Y630F. Cycloheximide was added at specific time points (4h, 2h, 1h and 0h) before lysis. Lysates were subjected to western blotting.

A) *In vitro* phosphorylation of cofilin



B) T505 phosphorylation by upstream kinases

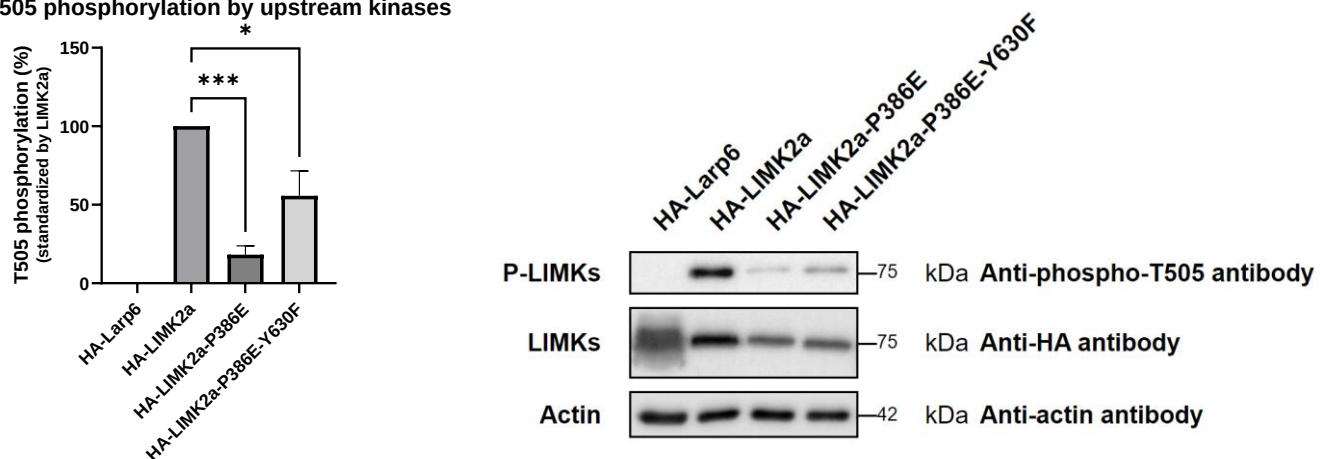


Figure 8: Y630 plays a crucial role for LIMK2 Dimerization and transphosphorylation which are crucial for LIMK2 activation.

A) *Dimerization and transphosphorylation mediated by Y630 are necessary to activate LIMK2.*

HEK-293 cells were transfected with one of the five HA-tagged LIMK2a constructs (WT LIMK2a, LIMK2a-Y630F, LIMK2a-P386E-Y630F or LIMK2a-P386E) or an unrelated HA-tagged protein, Larp6, as a negative control. Anti-HA immunoprecipitated proteins and 6xhis-cofilin were used in the kinase assay. The anti-HA immunoprecipitates were also subjected to anti-HA immunoblotting and Coomassie blue staining. Quantification of the relative cofilin phosphorylation is shown in the left graph. Relative cofilin phosphorylation of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100. B) *Transphosphorylation is preliminary to T505 phosphorylation.* HEK-293 cells were co-transfected with one of the three HA-tagged LIMK2a constructs (WT LIMK2a, LIMK2a-P386E, LIMK2a-P386E-Y630F) and cMyc-tagged ROCK. HA-tagged Larp6 was used as a negative control. Lysates were subjected to western blotting. Quantification of the ratio of phospho-LIMK versus lysates is shown in the left graph. phospho-LIMK versus lysates ratio of WT LIMK2a transfected cells was normalized to 100.

Supplementary data

Plasmid	Description	Reference
pcDNA3-(HA)2-LARP6	PCMV-(HA)2-LARP6	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a	Vallée et al., 2012
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-ΔCT591	PCMV-(HA)2-LIMK2ΔCT591	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-ΔCT602	PCMV-(HA)2-LIMK2ΔCT602	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-ΔCT609	PCMV-(HA)2-LIMK2ΔCT609	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-ΔCT611	PCMV-(HA)2-LIMK2ΔCT611	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-T625A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-T625A	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-S627A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-S627A	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-Y630A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-Y630A	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-T633A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-T633A	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-S636A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-S636A	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pEN1-(YFP)	pCMV-(YFP)	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pEN1-(YFP)-LIMK2-2a	pCMV-(YFP)	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pEN1-(YFP)-LIMK2-2a-Y630A	pCMV-(YFP)	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK1	pcDNA3-(HA)2-LIMK1	Team H. Bénédicti & B. Vallée
pcDNA3-(HA)2-LIMK1-Y632A	pcDNA3-(HA)2-LIMK1-Y632A	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-Y630S	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-Y630S	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-Y630E	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-Y630E	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-Y630F	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-Y630F	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-T505A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-T505A	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-T505EE	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-T505EE	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-P386E	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-P386E	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-D451N	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-D451N	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-P386E-Y630F	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-P386E-Y630F	This work
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-T505A-Y630F	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-T505A-Y630F	This work

Table 1: Details of the plasmids used in this study

Construction	Origin vector	Primer	Sequence (5'-3')	Fragment length
HA-LIMK2-2a-Y630A	HA-LIMK2-2a	For	GAGCATGCAGGCCGGCCTGACC	7286
		Rev	ACAGTGTGGTCCAACCTCC	
YFP-LIMK2-2a-Y630A	HA-LIMK2-2a-Y630A	For	CGACGTGAATTCGCCACCATGTCCGCGCTGGCGGGTGAA	1947
		Rev	CTGAGCCCCGCGGTGAGGGAGGTGAGTCCCGGGTCA	
HA-LIMK1-Y632A	HA-LIMK1	For	CTGGGAGACCGCCCGCGCGGC	7385
		Rev	AAACCTCTGTCCAGCTGCTC	
HA-LIMK2-2a-T505A	HA-LIMK2-2a	For	GAAGCGCTACGCGGTGGTGGG	7286
		Rev	TTGCGGTCGTTCTTGCGC	
HA-LIMK2-2a-Y630S	HA-LIMK2-2a	For	GAGCATGCAGTCCGGCCTGAC	7286
		Rev	ACAGTGTGGTCCAACCTCC	
HA-LIMK2-2a-Y630E	HA-LIMK2-2a	For	GAGCATGCAGGAGGGCCTGACCC	7286
		Rev	ACAGTGTGGTCCAACCTCC	
HA-LIMK2-2a-Y630F	HA-LIMK2-2a	For	GAGCATGCAGTTCGGCCTGAC	7286
		Rev	ACAGTGTGGTCCAACCTCC	

HA-LIMK2-2a-T505EE	HA-LIMK2-2a	For	GAAGCGCTACGAGGAGGTGGTGGGAAACCC	7289
		Rev	TTGCGGTCGTTCTTGCGC	
HA-LIMK2-2a-P386E	HA-LIMK2-2a	For	CCTGGACCACGAGAATGTGCTCAAG	7286
		Rev	CTGCGCATCACTTTCACC	
HA-LIMK2-2a-D451N	HA-LIMK2-2a	For	CATCCACCAGGAATCTGAACTC	7286
		Rev	ATGCACATAGAGTGCAAATAG	
HA-LIMK2-2a-P386E-Y630F	HA-LIMK2-2a-Y630F	For	CCTGGACCACGAGAATGTGCTCAAG	7286
		Rev	CTGCGCATCACTTTCACC	
HA-LIMK2-2a-S283A	HA-LIMK2-2a	For	GAGGAGACGTGCCCTAAGGCG	7286
HA-LIMK2-2a-T494A	HA-LIMK2-2a	For	CAAGAAACGCGCCTTGCGCAA	7286
		Rev	GTGGTGGCCTTCTCCATG	
HA-LIMK2-2a-S283A-T494A	HA-LIMK2-2a-S283A	For	CAAGAAACGCGCCTTGCGCAA	7286
		Rev	GTGGTGGCCTTCTCCATG	
HA-LIMK2-2a-S283A-T494A-T505A	HA-LIMK2-2a-S283A-T494A	For	GAAGCGCTACGCGGTGGTGGG	7286
		Rev	TTGCGGTCGTTCTTGCGC	

Table 2: Details of the primers and vectors used in this study

Author Contributions: Original draft preparation and writing, E.V. and B.V.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, University of Orleans, La Ligue contre le Cancer (grant number PM/FP/202-251), the French Association Neurofibromatosis et Recklinghausen, the French Agence Nationale de la recherche (grant number ANR-19-CE18-0016-02), and the Région Centre Val de Loire.

Acknowledgments: We would like to thank also the RTR Motivhealth, the Ligue contre le Cancer Grand Ouest (comités d'Eure et Loire et du Loiret), Cancéropole Grand Ouest, Réseau Molécules marines, métabolisme et cancer for their support. Figures were created with Sciugo.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

I.3. Données complémentaires

I.3.1. Recherche de potentiels sites de phosphorylation de LIMK2 médiés par la tyrosine 630

I.3.1.a. Introduction

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que le phénomène de dimérisation et de transphosphorylation des LIMKs était un prérequis essentiel à leur activation ainsi qu'à leur activité sur la cofiline et que la tyrosine 630/632 jouait un rôle crucial dans ce processus.

Cette transphosphorylation pourrait s'effectuer sur un ou plusieurs sites des LIMKs, de façon simultanée ou séquentielle, avec pour conséquence un changement dans la conformation des protéines. Ce changement de conformation pourrait permettre la phosphorylation des LIMKs sur la thréonine 505/508 et l'enfouissement de la boucle d'activation (conformation « DFG in ») dans une poche hydrophobe située en arrière du site actif, libérant ce dernier pour que s'effectue le phosphotransfert sur la sérine 3 de la cofiline. In fine, ce processus permettrait aux LIMKs d'avoir la structure-fonction nécessaire à leur activité sur la cofiline.

Or, les LIM kinases sont au cœur d'un vaste réseau d'interactions moléculaires. Elles phosphorylent et sont phosphorylées par de nombreux partenaires permettant ainsi la régulation de multiples voies de signalisation. Trois sites de phosphorylation de LIMK2 ont été décrits dans la littérature : la thréonine 505, site d'activation canonique des LIMKs et phosphorylée par de nombreux partenaires au nombre desquels ROCK, PAK et MRCK α , la thréonine 494 et la sérine 283, toutes deux phosphorylées par Aurora A (AURKA). En particulier, AURKA interagit avec LIMK2 et l'active par phosphorylation sur les sites Sérine 283, Thréonine 494 et le site d'activation canonique Thréonine 505 [117]. Johnson et al. (2012) ont montré que la phosphorylation sur T505 entraîne une augmentation de l'activité kinase de LIMK2, et que les phosphorylations sur S283 et T494 participent à une diminution de la dégradation de LIMK2 par le protéasome et la restriction de sa localisation cellulaire dans le cytoplasme [117]. Nous avons donc cherché à déterminer si ces sites de phosphorylation de LIMK2 (S283 et T494), capables de moduler sa stabilité et son activité lorsqu'ils sont phosphorylés, pouvaient également constituer des sites de transphosphorylation.

I.3.1.b. Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes employés dans cette section sont identiques à ceux détaillés dans l'article 1. Les plasmides mentionnés dans cette étude sont listés dans la **Table 1**. Les amorces et vecteurs utilisés pour les construire sont listés dans la **Table 2**.

Plasmide	Description	Référence/source
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-S283A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-S283A	Cette thèse
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-T494A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-T494A	Cette thèse
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-S283A-T494A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-S283A-T494A	Cette thèse
pcDNA3-(HA)2-LIMK2-2a-S283A-T494A-T505A	PCMV-(HA)2-LIMK2-2a-S283A-T494A-T505A	Cette thèse

Table 1: Détails des plasmides utilisés pour l'étude des sites de phosphorylation T494A, S283A et T505A.

Construction	Plasmide template	Sens	Séquence (5'-3')	Longueur du fragment
HA-LIMK2-2a-S283A	HA-LIMK2-2a	For	GAGGAGACGTGCCCTAAGGCG	7286
		Rev	AGTGTCCCTCCAGATTCTC	
HA-LIMK2-2a-T494A	HA-LIMK2-2a	For	CAAGAAACGCGCCTTGCGCAA	7286
		Rev	GTGGTGGCCTTCTCCATG	
HA-LIMK2-2a-S283A-T494A	HA-LIMK2-2a-S283A	For	CAAGAAACGCGCCTTGCGCAA	7286
		Rev	GTGGTGGCCTTCTCCATG	
HA-LIMK2-2a-S283A-T494A-T505A	HA-LIMK2-2a-S283A-T494A	For	GAAGCGCTACGCGGTGGTGGG	7286
		Rev	TTGCGGTCGTTCTTGCGC	

Table 2 : Amorces et vecteurs utilisés pour la construction des plasmides pour l'étude des sites de phosphorylation T494A, S283A et T505A.

I.3.1.c. Résultats

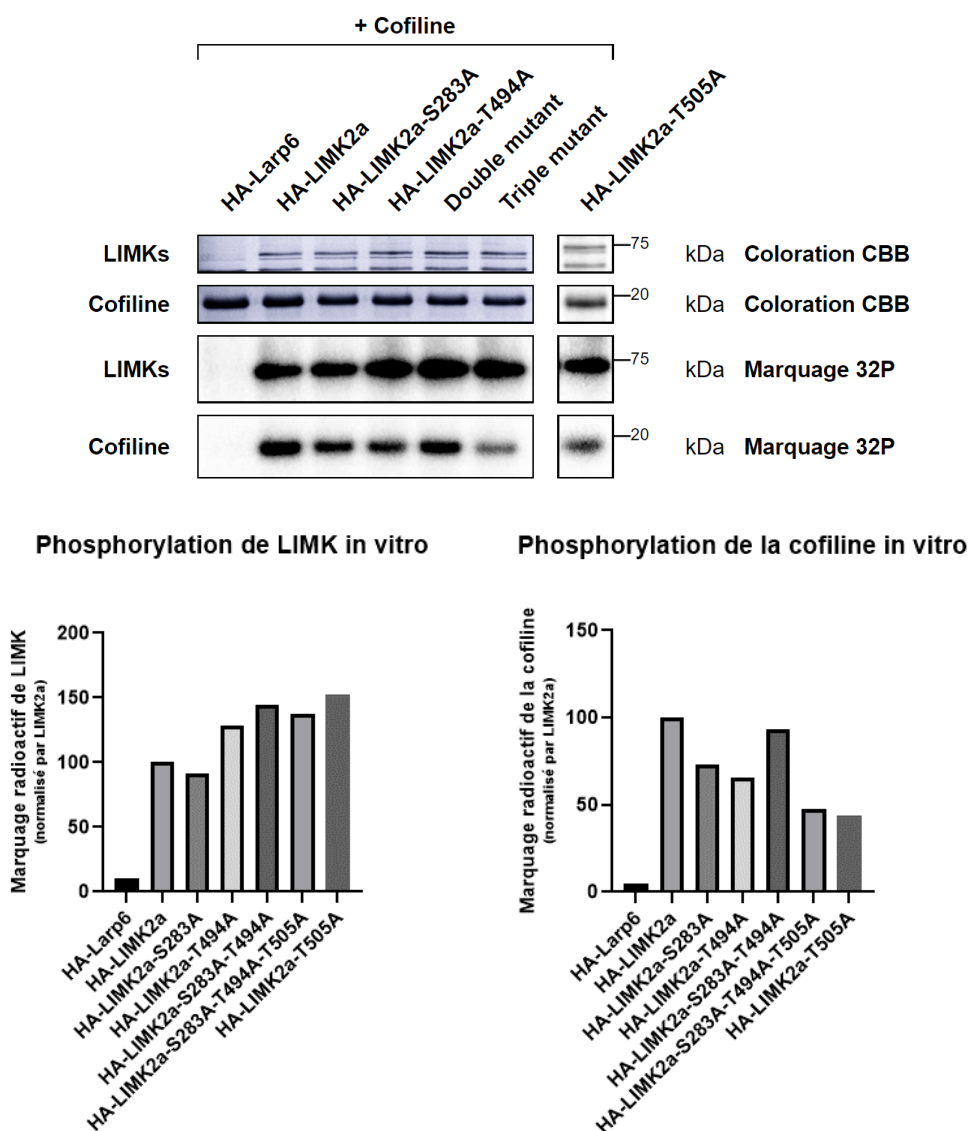


Figure 8: Les mutations S283A et T494A n'affectent pas la phosphorylation de LIMK2.

Les cellules HEK-293 ont été transfectées avec un plasmide permettant l'expression des mutants suivants : HA-LIMK2a-S283A, HA-LIMK2a-T494A, HA-LIMK2a-T505A, HA-LIMK2a-S283A-T494A ou HA-LIMK2a-S283A-T494A-T505A. La protéine HA-Larp6 a été utilisée comme contrôle négatif. Les protéines tagguées HA sont immunoprécipitées et incubées avec de la cofiline recombinante 6-his et du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Les protéines sont séparées par gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie puis révélées par autoradiographie. La phosphorylation de la cofiline par LIMK2a sauvage a été normalisée à 100. La quantification relative de la phosphorylation de LIMK sur le graphique de gauche. La quantification relative de la phosphorylation de la cofiline par les différents mutants est montrée sur le graphique de droite. La phosphorylation de LIMK2a sauvage a été normalisée à 100.

Par mutagenèse dirigée, nous avons construit les mutants LIMK2a-T505A, LIMK2a-S283A et LIMK2a-T494A. Nous avons aussi voulu nous affranchir d'un potentiel effet de compensation d'un site de phosphorylation sur un autre en construisant des « double » (LIMK2a-S283A-T494A) et « triple » mutants (LIMK2a-S283A-T494A-T505A). Nous avons ensuite testé la phosphorylation de ces différents mutants par notre test in vitro en radioactivité $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, ainsi que leur activité kinase sur la cofiline.

Par test de phosphorylation in vitro au $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP, nous avons montré que tous les mutants sont phosphorylés (**Figure 8**). Nous avons également montré qu'ils sont tous capables de phosphoryler la cofiline. Il existe toutefois des différences d'activité entre les différentes constructions. Les mutants LIMK2a-S283A, LIMK2a-T494A et le « double » mutant semblent avoir une activité légèrement en-deçà, autour de 65-70%, ou équivalente à celle de la protéine sauvage. Le « triple » mutant, en revanche, présente une activité kinase en-dessous de celle de la protéine sauvage, d'environ 50%, reflétant l'impact de la mutation T505A sur l'activité de LIMK2 (**Figure 8**). Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Cependant, ces résultats suggèrent que la S283 et la T494 ne sont pas des sites de transphosphorylation de LIMK2.

I.3.1.d. Conclusion

En 2006, Li et al. ont décrit que les LIM kinases sont capables de se dimériser via le concours de la protéine Hsp90 et de se transphosphoryler, avec pour conséquence une augmentation de leur stabilité et de leur activité kinase sur la cofiline [116]. Les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse montrent que ce phénomène est en réalité un prérequis essentiel à la phosphorylation des LIMKs sur la thréonine 505/508, leur site canonique d'activation, nécessaire à leur activité kinase sur la cofiline. Or, à ce jour, les sites de transphosphorylation des LIM kinases ne sont toujours pas clairement identifiés, même s'il a été envisagé qu'ils se situeraient du côté de l'extrémité C-terminale des protéines, possiblement au niveau de leur domaine kinase et majoritairement sur des sérines [2,108,116,118]. Au vu de nos résultats, les mutations S283A et T494A ne semblent pas avoir d'effet notable sur l'activité kinase de LIMK2 sur la cofiline. Seule la mutation T505A

a effectivement conduit à une diminution forte de la phosphorylation de la cofiline, en accord avec les résultats obtenus par Johnson et al. [117], quoiqu'il persiste une activité d'environ 50% même en l'absence du site d'activation canonique des LIMKs, la T505. Ainsi, si les sites de phosphorylation S283A et T494A jouent assurément un rôle dans la stabilité de la protéine [117], elles ne participent probablement pas directement à l'activation de la protéine et à son activité kinase sur la cofiline. De la même manière, le site de phosphorylation T505 seul ne permet pas non plus d'avoir une activité optimale sur la cofiline, tout comme son absence n'entraîne pas une perte totale d'activité de LIMK2. Par ailleurs, la mutation des sites de phosphorylation S283, T494 et T505 en alanine, un acide aminé non-phosphorylable, n'a pas entraîné de diminution de la phosphorylation globale de la protéine.

En conclusion, les acides aminés S283, T494 et T505 ne constituent probablement pas les sites de transphosphorylation recherchés de LIMK2. Il existe donc probablement d'autres sites de la protéine qui, eux, sont toujours phosphorylés. Pour LIMK1, trois autres sites de phosphorylation sont décrits dans la littérature. Deux d'entre eux ne sont pas conservés chez LIMK2. Il serait intéressant de tester ces trois sites de phosphorylation par une approche similaire sur LIMK1. Une autre approche, plus globale, consisterait à réaliser une étude de phosphoprotéomique. En seconde intention, il serait aussi intéressant de tester les acides aminés phosphorylables conservés chez LIMK2 au cours de l'évolution, comme nous l'avons fait précédemment par mutation dirigée, en mutant ces résidus en acides aminés non-phosphorylables, alanine par exemple, et en évaluant l'impact de cette mutation sur l'activité kinase des LIMKs sur la cofiline. En particulier, nous pourrions regarder les résidus conservés au niveau du domaine kinase. En effet, Pröschel et al. (1995) suggèrent que le domaine kinase est capable de s'auto-phosphoryler, ce qui indique qu'il contient des acides aminés en mesure d'être phosphorylés et en particulier des sérines [108]. Cette hypothèse a été appuyée par d'autres auteurs dans la littérature [2,116,118].

I.3.2. Expression des domaines kinase de LIMK1 et LIMK2 en système Baculovirus

I.3.2.a. Introduction

Les résultats obtenus au cours de ma thèse, y compris lors des tests de phosphorylation *in vitro*, ont pour l'essentiel été réalisés sur des lysats cellulaires de cellules transfectées. Même si les protéines d'intérêt ont été immunoprécipitées, il n'est pas possible d'exclure que d'autres protéines co-immunoprécipitées ont pu avoir une influence sur les résultats obtenus lors des expérimentations *in vitro*. De même, il est envisageable que les

résultats obtenus soient propres au système cellulaire utilisé (HEK-293, des cellules embryonnaires humaines) et puissent varier d'un système à un autre. Aussi, pour confirmer nos découvertes, nous avons voulu voir si les résultats obtenus avec les lysats étaient indépendants de l'environnement cellulaire et de la méthode choisie, et pouvaient être reproduits avec des protéines purifiées produites dans un système orthologue.

Dans la littérature et dans le commerce, les LIM kinases purifiées sont produites en cellules de *Spodoptera frugiperda*, Sf21 ou Sf9, grâce au système baculovirus. Utilisé comme vecteur d'expression de protéines recombinantes, le système baculovirus présente de nombreux avantages au titre desquels sa facilité d'utilisation, son rendement de production et sa sécurité d'utilisation [119]. Quelques désavantages sont toutefois notables, notamment au niveau de la glycosylation des protéines, qui diffère entre les cellules d'insecte et les cellules de mammifère, ou encore la lyse des cellules hôtes du fait du cycle lytique du baculovirus [119]. Malgré tout, c'est un système qui est robuste, maîtrisé depuis longtemps et utilisé classiquement pour la production des LIM kinases, c'est pourquoi nous avons fait le choix de l'utiliser nous aussi pour la production de nos protéines recombinantes.

J'ai eu la chance d'être reçue pendant une semaine au sein de l'équipe « Biologie des infections à Polyomavirus » de l'Université de Tours, dirigée par le Professeur Antoine Touzé, afin d'acquérir des compétences dans l'utilisation du système baculovirus comme vecteur d'expression pour la production de protéines en cellules d'insecte Sf21. À l'issue de cette semaine, j'ai été en mesure de produire les domaines kinases des protéines recombinantes LIMK2a sauvage et LIMK2a-Y630A. Le matériel et méthodes ainsi que les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

I.3.2.b. Matériel et méthodes

Matériels

Les cellules Sf21 (*Spodoptera frugiperda* 21) utilisées pour la production des protéines recombinantes ont été cultivées en culture stationnaire à 27°C en conditions atmosphériques dans du milieu de Grace (Grace's insect medium, #11595030, Gibco BRL) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, #11570506, Gibco BRL). L'anticorps anti-LIMK2 a été acheté chez Abcam (ab45165), l'anticorps anti-6-histidine a été acheté chez Takara (#631212).

Construction du bacmide et production de baculovirus recombinant

Les bacmides ont été produits grâce au système commercial Bac-to-Bac™ (Invitrogen™ Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System, #10403802) selon les recommandations du fournisseur.

L'ADN codant pour les domaines kinases taggués 6-histidine a été cloné dans le vecteur pFastBac grâce aux amorces Bac-KIN2a For (CGACGTGAATTCATGCACCATCACCATCACCATGAAAACCTGTACTTCCAAAGTATCTCCAAGTCCCCTGGC) et Bac-KIN2a Rev (CTGAGCTCTAGACTAGGGAGGTGAGTCCCGGGTCAGGCC), et transformé dans des bactéries *E. Coli* DH10Bac porteuses d'un bacmide parent contenant l'intégralité du génome du baculovirus. La cassette d'expression du plasmide pFastBac s'est recombinée avec le bacmide parent dans *E. Coli* DH10Bac par transposition, grâce à la présence des éléments transposables du transposon Tn7 (Tn7R et Tn7L). Le bacmide ainsi modifié contient l'ADN d'intérêt, les gènes de résistance permettant la sélection antibiotique et le gène codant pour la β -galactosidase sous promoteur inductible à l'IPTG permettant une sélection blanc/bleue des bactéries recombinantes. Les colonies blanches obtenues sont mises en culture sous agitation pendant 36h à 37°C, en présence d'antibiotiques (kanamycine, gentamycine, tetracycline) pour permettre l'extraction de l'ADN bacmidique. L'ADN bacmidique est ensuite extrait par minipréparation d'ADN, ou lyse alcaline. Les cellules sont mises en suspension dans une solution I, tampon isotonique contenant Tris-HCl, glucose, EDTA à pH 8. Elles sont ensuite lysées au moyen d'une solution II contenant un détergent fort (ici, dodécyl sulfate de sodium (SDS) 1%) en présence de soude (NaOH), à pH 13. À ce pH très alcalin, l'ADN est dénaturé. On neutralise ensuite rapidement la solution à l'aide d'une solution III contenant de l'acétate de potassium et de l'acide acétique glacial, ce qui permet la neutralisation du pH de la solution II et la renaturation des acides nucléiques. L'ADN chromosomique, très long, ne parvient pas à se réappairier complètement et forme des enchevêtrements insolubles tandis l'ADN bacmidique, plus court, parvient à se renaturer et se mettre en solution. On sépare alors les espèces par centrifugation. Les protéines précipitées, sont également éliminées avec le détergent et l'ADN chromosomique. L'ADN bacmidique est alors lavé et concentré par précipitation à l'alcool. La présence du bacmide est détectée par PCR en utilisant des amorces universelles s'hybridant dans le bacmide de part et d'autre des séquences du transposon Tn7. Le principe de la transposition

du pFastBac dans le bacmide, les amorces utilisées pour la PCR et le gel d'agarose sont présentés **Figure 9**.

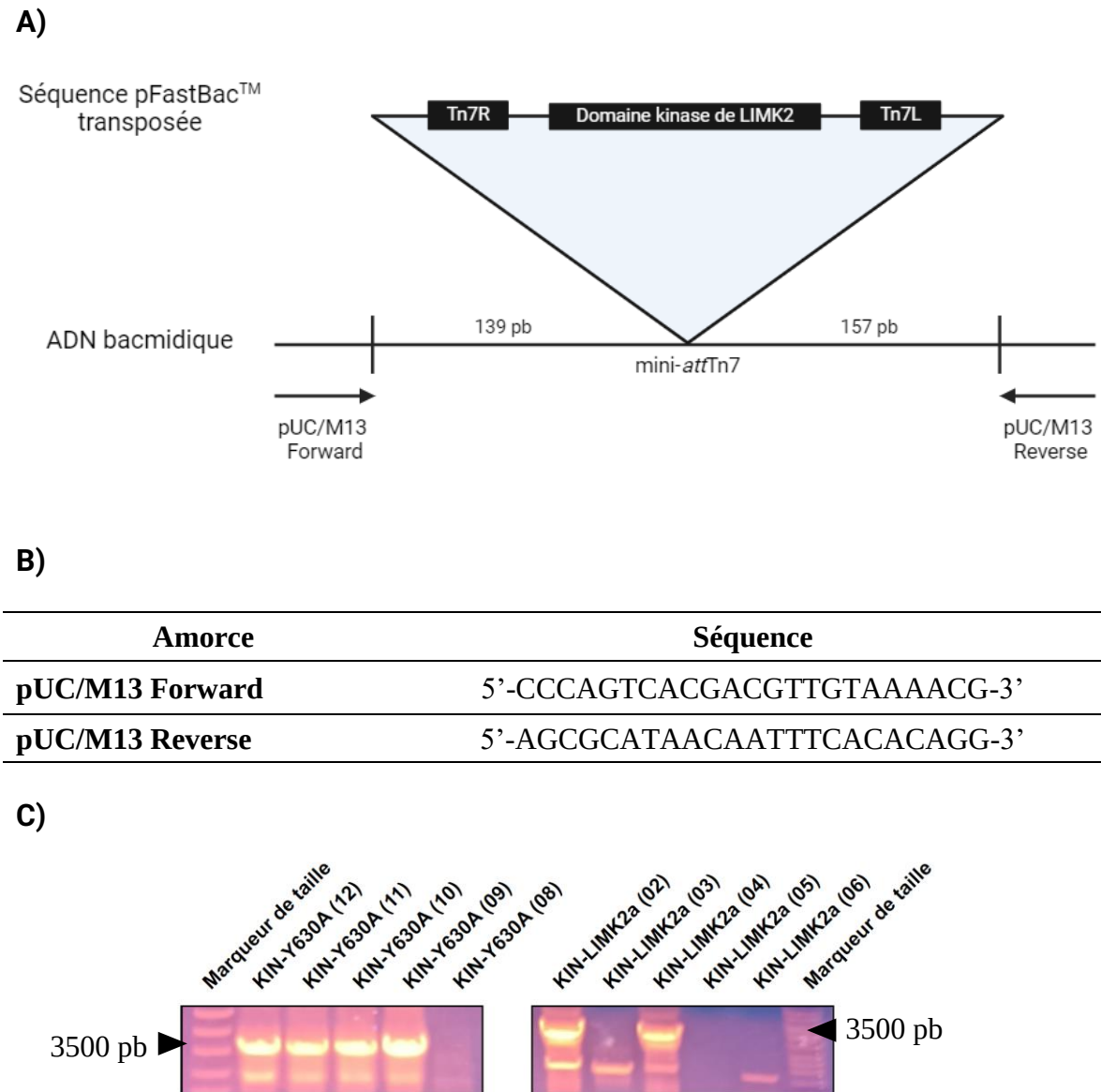


Figure 9 : Construction du bacmide contenant l'ADN codant des domaines kinases de LIMK2a sauvage et du mutant LIMK2a-Y630A.

A) Illustration de la transposition de la séquence du pFastBac contenant l'ADN complémentaire du gène d'intérêt (domaine kinase de LIMK2a sauvage ou LIMK2a-Y630A) dans l'ADN bacmidique. **B)** Amorces ayant servi à détecter la transposition de la séquence pFastBac dans le bacmide par PCR. **C)** Photographie de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification de PCR. Les bandes d'amplification sont révélées par incorporation de bromure d'éthidium et illumination sur table UV.

Les cellules Sf21 sont ensuite transfectées par le bacmide afin de permettre la production du stock P0 de baculovirus. Environ 8×10^5 de cellules Sf21 sontensemencées par puits d'une plaque 6-puits. La transfection a été réalisée grâce à la CellFECTIN, agent de transfection commercial inclus dans le kit commercial Bac-to-Bac™ selon les

recommandations du fournisseur. Pour cela 5µl de bacmides purifiés ont été complexés à 8µL d'agent de transfection dans du milieu de Grace sans SVF, puis le mélange a été réparti sur les cellules. Après cinq heures d'incubation du mélange bacmide/CellFECTIN avec les cellules, le milieu a été changé par du milieu de Grace complémenté. Les cellules ont ensuite été mises à l'incubateur à 27°C pendant quatre à cinq jours.

Quatre à cinq jours post-transfection, les cellules vont commencer à produire du baculovirus recombinant que l'on va pouvoir récolter dans le surnageant. La titration virale étant alors trop faible pour permettre la production des protéines recombinantes, cet inoculum initial P0 va être utilisé pour infecter de nouvelles cellules Sf21 et générer un stock viral P1 de titration plus élevée et avec lequel on va pouvoir réaliser l'infection d'un plus grand volume de culture de cellules Sf21. Les cellules ayant servi à générer le stock P1 peuvent d'ores et déjà être lysées pour contrôler la production initiale des protéines recombinantes. Les inoculums sont conservés à l'obscurité à 4°C pour une conservation à court-terme et à -80°C pour une conservation à long terme.

Lyse des cellules Sf21 du stock P1 et détection des protéines recombinantes

Après avoir récolté le stock P1 de baculovirus, les cellules ont été lysées dans 1 mL de tampon de lyse à 0,1% de Triton X-100 (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA, 50 mM de NaF, 10 mM de sodium pyrophosphate, 1 mM de Na₃VO₄, 20 mM de p-nitrophenyl phosphate, 20 mM de β-glycerophosphate, 10 µg/mL d'aprotinine, 0,05 µg/mL d'acide okadaïque, 1 µg/mL de leupeptin, and 1 mM de PMSF) et incubées sur glace pendant 10 minutes. Après 10 minutes de centrifugation à 10.000xg à 4°C, le surnageant a été récupéré et le tampon Laemmli a été ajouté. Les lysats cellulaires ont ensuite été stockés à -80°C avant d'être analysés par western-blot.

Les plasmides mentionnés dans cette étude sont listés dans la **Table 3**. Les amorces et vecteurs utilisés pour les construire sont listés dans la **Table 4**.

Plasmide	Description	Référence/source
pFastBac-6his-KIN-LIMK2-2a	pPH-6his-KIN-LIMK2-2a	Cette thèse
pFastBac-6his-KIN-LIMK2-2a-Y630A	pPH-6his-KIN-LIMK2-2a-Y630A	Cette thèse

Table 3: Détails des plasmides utilisés pour la génération de baculovirus recombinants.

Construction	Plasmide template	Sens	Séquence (5'-3')	Longueur du fragment
6his-KIN-LIMK2-2a	HA-LIMK2-2a	For	CGACGTGAATTCATGCACCATCACCAT CACCATGAAAACCTGTACTTCCAAAGT ATCTCCAAGTCCCCTGGC	1116
		Rev	CTGAGCTCTAGACTAGGGAGGTGAGTC CCGGGTCAGGCC	
6his-KIN-LIMK2-2a-Y630A	HA-LIMK2-2a-Y630A	For	CGACGTGAATTCATGCACCATCACCAT CACCATGAAAACCTGTACTTCCAAAGT ATCTCCAAGTCCCCTGGC	1116
		Rev	CGACGTTCTAGACTAGGGAGGTGAGTC CCGGGT	

Table 4 : Amorces et vecteurs utilisés pour la construction des plasmides pFastBac.

I.3.2.c. Résultats

J'ai donc construit des baculovirus recombinants exprimant les domaines kinases de LIMK2a sauvage (KIN-LIMK2a) ou du mutant LIMK2a-Y630A (KIN-LIMK2a-Y630A). Après infection des cellules Sf21, je les ai lysées et j'ai analysé les lysats par western-blot. La présence des domaines kinases de LIMK2a sauvage ou du mutant LIMK2a-Y630A dans les lysats cellulaires a été montrée par l'utilisation d'un anticorps anti-LIMK2 et d'un anticorps dirigé contre le tag 6-histidine avec lequel les protéines recombinantes sont étiquetées. Avec ces deux anticorps, j'ai pu mettre en évidence la présence des protéines d'intérêt dans les lysats cellulaires, attestant que les baculovirus qui avaient été construits étaient efficaces pour induire la production des domaines kinases de LIMK2a sauvage et mutante dans les cellules d'insecte Sf21, et ouvrant ainsi la voie à de futures expériences sur des protéines purifiées (**Figure 10**).

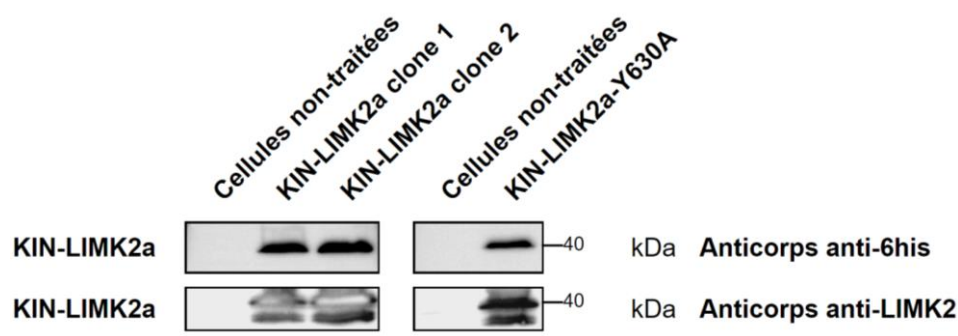


Figure 10 : Production des domaines kinases de LIMK2a sauvage et du mutant LIMK2a-Y630A en cellules d'insecte.

Les cellules Sf21 ont été infectées avec des baculovirus permettant l'expression des domaines kinases de la protéine LIMK2a sauvage ou du mutant LIMK2a-Y630A. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par western-blot avec un anticorps dirigé contre le tag 6-histidine ou contre la protéine LIMK2a.

I.3.2.d. Conclusion

La production des domaines kinases de LIMK2a sauvage et du mutant LIMK2a-Y630A en cellules d'insecte est un premier pas vers des expériences complémentaires qui auraient été particulièrement intéressantes dans le cadre de ce sujet de thèse. Malheureusement, je n'ai pas eu le temps de produire ces protéines en plus grande quantité et de les purifier.

Dans un premier temps, j'aurais pu confirmer les résultats que j'ai obtenu au cours de ma thèse quant au rôle de la tyrosine 632/630 sur des LIMKs produites dans un système orthologue et purifiées pour s'affranchir de l'environnement cellulaire et des spécificités liées au choix du système d'expression eucaryote en HEK-293. Ainsi, à titre d'exemple, les tests de phosphorylation de la cofiline pourraient être menés *in vitro* sur protéines purifiées afin de voir si les résultats préalablement obtenus dépendent uniquement de la mutation Y630A ou s'il existe un effet spécifique dû à l'environnement cellulaire. Cependant, mes travaux de thèse montrent que la phosphorylation de la cofiline nécessite une activation de LIMK2 qui s'opère i) dans un premier temps par dimérisation et une transphosphorylation, laquelle nécessite probablement le concours de la protéine Hsp90, et ii) dans un second temps par une phosphorylation de la T505 sur la boucle d'activation de la protéine par une kinase activatrice. Une protéine purifiée, théoriquement, ne devrait pas être en mesure de phosphoryler la cofiline de façon optimale puisqu'elles ne seraient pas en mesure de se dimériser sans la présence de la protéine Hsp90, ni ne serait activée sur la T505 sans la présence de protéines activatrices dans le lysat cellulaire. Les résultats issus de ces tests, quels qu'ils soient, pourraient enrichir notre compréhension des mécanismes mis en évidence au cours de ces études moléculaires.

La purification de domaine kinase du mutant LIMK2a-Y630A aurait également pu permettre des études préliminaires sur la structure de ce domaine et de son extrémité C-terminale. J'ai émis l'hypothèse que la tyrosine 630 jouait un rôle dans la structure-fonction de LIMK2a et que sa mutation en alanine entraînait une déstructuration du domaine C-terminal de la protéine avec un effet direct sur son activation et sur son activité kinase vis-à-vis de la cofiline. L'obtention de protéines purifiées pourrait permettre de mettre en évidence une différence entre la structure de l'extrémité C-terminale de LIMK2a sauvage et celle du mutant LIMK2a-Y30A, par exemple par utilisation du dichroïsme circulaire ou, de façon plus poussée, par RMN ou cristallographie aux rayons X. Ces données pourraient permettre de confirmer les hypothèses émises quant au rôle de la tyrosine 632/630, et notamment de son cycle aromatique, dans la structure-fonction des LIM kinases.

1.4. Conclusion du chapitre I

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation de l'activité des LIM kinases vis-à-vis de leur substrat principal, la cofiline. Mes études moléculaires des LIMKs ont démontré qu'un acide aminé de l'extrémité C-terminale des LIMKs, la tyrosine 630 pour LIMK2 et la tyrosine 632 pour LIMK1, joue un rôle-clé par leur activité vis-à-vis de leur substrat principal, la cofiline. Cette tyrosine est requise pour permettre la dimérisation des protéines, probablement via le concours de la protéine Hsp90, et leur transphosphorylation sur un ou plusieurs sites de phosphorylation jusqu'alors non-identifiés. Ces phosphorylations permettraient d'augmenter la stabilité des LIMKs, mais également leur phosphorylation par des kinases activatrices sur leur site d'activation canonique, la thréonine 505 pour LIMK2 et la thréonine 508 pour LIMK1, permettant ainsi leur activité kinase optimale sur la cofiline. Ainsi l'activation de ces protéines par phosphorylation de leur T505/T508, tel que décrit dans la littérature, est nécessaire mais pas suffisante pour permettre une activité kinase optimale sur la cofiline. Les LIMKs doivent au préalable dimériser et s'autophosphoryler, un mécanisme médié par leur Y630/632 qui jouerait un rôle crucial dans la structure-fonction de la protéine, de par sa nature aromatique très particulière.

Nous ne sommes malheureusement pas parvenus à mettre en évidence les sites de transphosphorylation des LIMKs, ce qui aurait constitué un résultat fondamental dans l'étude moléculaire de ces protéines. Les sites de phosphorylation potentiels que nous avons testés, les sérine 283 et thréonine 494, et que l'on sait phosphorylées par AURKA sur

LIMK2, n'ont pas montré d'implication dans l'activité des LIM kinases vis-à-vis de leur substrat, même s'il est admis qu'ils jouent un rôle dans la stabilité des protéines. Les mutations de ces sites n'ont pas non plus eu d'effet sur la phosphorylation de la protéine entière, indiquant que d'autres sites de phosphorylation, encore non-découverts, restent malgré tout phosphorylables/phosphorylés. Pröschel et al. (1995) ont mis en évidence que le domaine kinase, tout seul, était capable d'autophosphorylation, en particulier sur des résidus sérines [108]. Il pourrait être intéressant de creuser cette hypothèse en mutant de façon spécifique les sérines présentes dans le domaine kinase. L'une des autres pistes envisagées pour mettre en évidence ces sites de phosphorylation est l'utilisation de la spectrométrie de masse pour des études de phosphoprotéomique qui permettraient, en comparant les profils des différents mutants construits au cours de l'étude, de mettre en évidence des sites de phosphorylation potentiellement intéressants mais qui n'ont pas encore été découverts à ce jour et qui jouent très certainement un rôle déterminant dans la régulation de l'activité des LIM kinases vis-à-vis de la cofiline.

Enfin, la production des domaines kinases de LIMK2a sauvage et du mutant LIMK2a-Y630A en système baculovirus, en plus de permettre de valider les résultats obtenus jusqu'alors dans un système orthologue, est une première étape vers la production de protéines purifiées. Ces dernières pourront permettre des études structurales essentielles à la compréhension du rôle joué par la tyrosine 632/630 dans la structure et la dynamique des LIMKs, lequel n'est toujours pas pleinement élucidé. Il semble y avoir une corrélation entre l'orientation de cette tyrosine et la position de l'hélice α C, un motif structural conservé qui, comme la boucle d'activation DFG sur laquelle se situe la thréonine 505, joue un rôle crucial dans le statut conformation active/inactive établissant ainsi un lien évident entre la tyrosine 632/630 et l'état d'activation de la protéine. Pour certaines kinases (EGF-r et B-Raf) cette hélice α C serait impliquée dans leur dimérisation, ce qui pourrait être aussi le cas pour les LIMKs, d'autant plus que la proline 394/386, impliquée dans l'interaction avec Hsp90 et la dimérisation des LIMKs, est située sur une boucle attenante à l'hélice α C. De la même façon, il existe un lien entre la présence d'un acide aminé aromatique en position 632/630 et la stabilité des LIMKs, indiquant que la tyrosine 632/630 pourrait jouer un rôle dans la structuration de l'extrémité C-terminale et, de fait, de la protéine entière, en plus de son rôle dans la dynamique fonctionnelle de la protéine. Des études structurales du mutant LIMK2a-Y630A pourraient ainsi permettre d'apporter des éléments de réponse à ces questions structurales qui, à la fin de cette étude, restent en suspens.

Malgré tout, les mécanismes de régulation mis en évidence par cette étude sont un premier pas vers une compréhension plus exhaustive du fonctionnement moléculaire de ces protéines, cibles thérapeutiques d'intérêt dont l'implication dans des phénomènes physiologique et pathologiques n'est, elle, plus à démontrer.

II. Développement de *stapled peptides* en vue d'inhiber spécifiquement l'interaction LIMK/cofiline : une nouvelle stratégie thérapeutique pour cibler la dynamique du cytosquelette

II.1. Introduction

Depuis de nombreuses années, les LIM kinases sont considérées comme des cibles thérapeutiques intéressantes du fait de leur implication dans la dynamique du cytosquelette [6]. En jouant un rôle dans le remodelage des filaments d'actine et dans celui des microtubules, les LIMK participent à de nombreux processus indispensables à la vie cellulaire (cycle cellulaire, apoptose, différenciation, motilité cellulaire...) [1]. La contrepartie, c'est que la littérature abonde également d'exemples où l'implication des LIMK dans des processus pathologiques est mise en évidence, au nombre desquels la tumorigenèse, le développement de maladies neurologiques et neurodégénératives ou encore les neurofibromatoses [1].

Toutefois, à ce jour, aucune petite molécule chimique développée pour cibler les LIMK n'a passé le stade des essais cliniques pour une mise sur le marché. Ainsi, en dépit de leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques, et malgré le fait que de nombreux inhibiteurs de type « petite molécule chimique » ciblant le site actif de ces protéines aient été développées au cours des dernières années, les LIM kinases restent des cibles « undruggable » [6]. Par ailleurs, on sait désormais que ces protéines se trouvent au cœur d'un vaste réseau d'interactions moléculaires et que certains de leurs partenaires sont impliqués dans des mécanismes cellulaires différents du remodelage du cytosquelette, si bien que la plupart des voies de signalisation impliquant les LIMK n'ont sans doute pas encore été complètement élucidées [1]. De fait, l'utilisation d'inhibiteurs ciblant l'activité kinase de ces protéines pourrait être préjudiciable quant à leurs rôles multiples dans le fonctionnement cellulaire, dont certains n'ont sans doute pas encore été parfaitement identifiés. En conséquence, il apparaît que de nouvelles stratégies d'inhibition doivent être envisagées pour espérer pouvoir développer des molécules qui soient à la fois hautement sélectives de ces kinases, très efficaces, capable de cibler spécifiquement leur rôle dans la dynamique du cytosquelette mais également avec de bons paramètres de pharmacocinétique (ADME : absorption, distribution, métabolisme et excrétion) et des effets secondaires limités.

Face à ces défis, la mise au point d'une stratégie ciblant de manière spécifique l'interaction protéine-protéine très atypique entre les LIMK et la cofiline, leur substrat dans le remodelage du cytosquelette, est une piste particulièrement prometteuse. L'interaction LIMK/cofiline a la particularité de reposer exclusivement sur l'enfouissement de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline dans un sillon de LIMK, permettant le basculement de la sérine 3 de la cofiline dans le site actif des LIMK et sa phosphorylation, selon un mécanisme de type « rock-and-poke » [35]. Ainsi, cette interaction est particulièrement adaptée à l'utilisation de *stapled peptides*, dont la conformation en hélice α est contrainte par des agrafes chimiques. Stratégiquement, l'idée est de synthétiser un *stapled peptide* qui mimerait l'hélice α de la cofiline et entrerait en compétition avec cette dernière pour l'interaction avec les LIMK. In fine, cela permettrait d'inhiber l'interaction entre les LIMKs et la cofiline et donc la phosphorylation de la cofiline par les LIMKs (**Figure 11**).

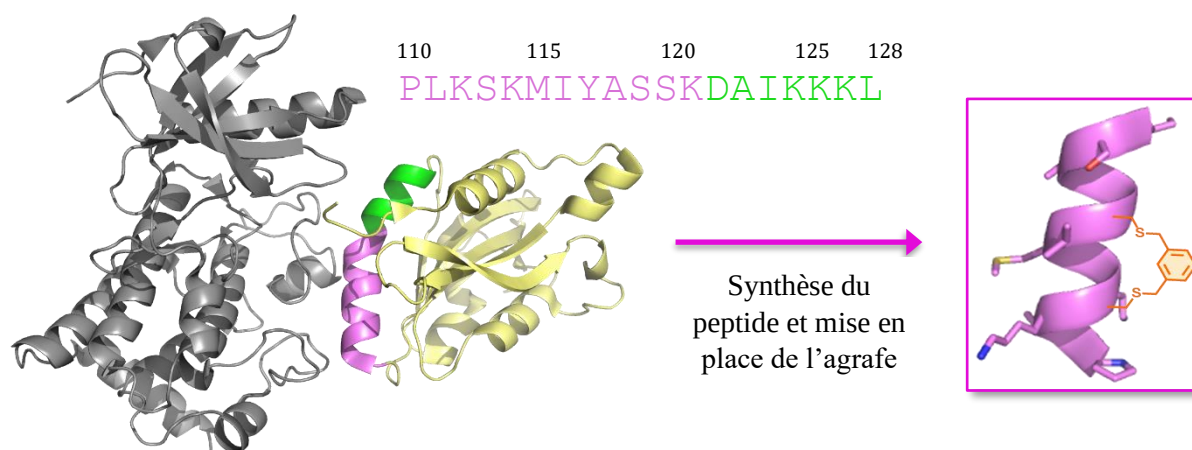


Figure 11 : Stratégie d'inhibition de l'interaction entre LIMK1 et la cofiline.

En gris, structure 3D de LIMK1, obtenue en cristallographie aux rayons X. En **jaune**, structure 3D de la cofiline, obtenue en cristallographie aux rayons X. En **rose** et **vert**, hélice $\alpha 5$ de la cofiline en interaction avec LIMK1 et dont la séquence, indiquée au-dessus, est utilisée pour mettre au point les *stapled peptides*. À droite, *stapled peptide* synthétisé à partir de la séquence native de la cofiline. Adaptée d'après Vincent Aucagne.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de participer au développement de *stapled peptides* ciblant de manière spécifique l'interaction entre les LIMK et la cofiline. En collaboration avec l'équipe « Protéines de Synthèse et Chimie Bioorthogonale » du CBM dirigée par Vincent Aucagne, différents *stapled peptides* ont été synthétisés (**Table 5**) et j'ai testé leur capacité à inhiber la phosphorylation de la cofiline par LIMK2, par test de phosphorylation in vitro. Ces données sont présentées ci-après.

II.2. Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes que j'ai employés pour l'étude de phosphorylation in vitro sont identiques à ceux détaillés dans l'article 1. Les peptides mentionnés dans cette étude sont listés dans la **Table 5**.

II.3. Résultats

II.3.1 Génération des stapled peptides par synthèse sur phase solide (SPPS)

Les *stapled peptides* ont été synthétisés par l'équipe « Protéines de Synthèse et Chimie Bioorthogonale » du CBM dirigée par Vincent Aucagne.

Le principe de la synthèse peptidique sur phase solide repose sur l'utilisation d'une résine (phase solide) disposant d'un lien covalent (*linker*) doté d'une fonction amine sur lequel vont être greffés les acides aminés les uns après les autres [121]. La fonction acide carboxylique de l'acide aminé libre en solution va réagir avec la fonction amine de l'acide aminé fixé sur la phase solide pour former la liaison peptidique. Une fois la synthèse terminée, le peptide est clivé du *linker* pour libérer l'extrémité carboxy-terminale du peptide. Cette synthèse a donc la particularité de s'effectuer de la terminaison carboxyle du peptide vers sa terminaison amine (« C-to-N »), en opposition avec la biosynthèse des protéines qui s'effectue, elle, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale [121].

Les acides aminés sont des espèces chimiques très réactives en raison de leurs nombreux groupes fonctionnels (fonction amine, fonction thiol, fonction carboxylique...) [122]. Pour optimiser les rendements de production des peptides et éviter les réactions parasites, les fonctions amines liées au carbone α et les fonctions des chaînes latérales des acides aminés sont masquées par des groupes protecteurs orthogonaux : il est possible de déprotéger un groupe spécifique sans nécessairement déprotéger les autres [122]. Au cours de la synthèse, le groupe protecteur de la fonction amine liée au carbone α doit être déprotégé pour permettre la condensation des acides aminés et l'élongation du peptide. Ainsi, la synthèse se fait selon des cycles de déprotection-couplage. La déprotection des chaînes latérales survient à la fin de la synthèse, au cours de l'étape qui permet également le clivage du *linker* et la libération du peptide néo-synthétisé [122] (**Figure 12**).

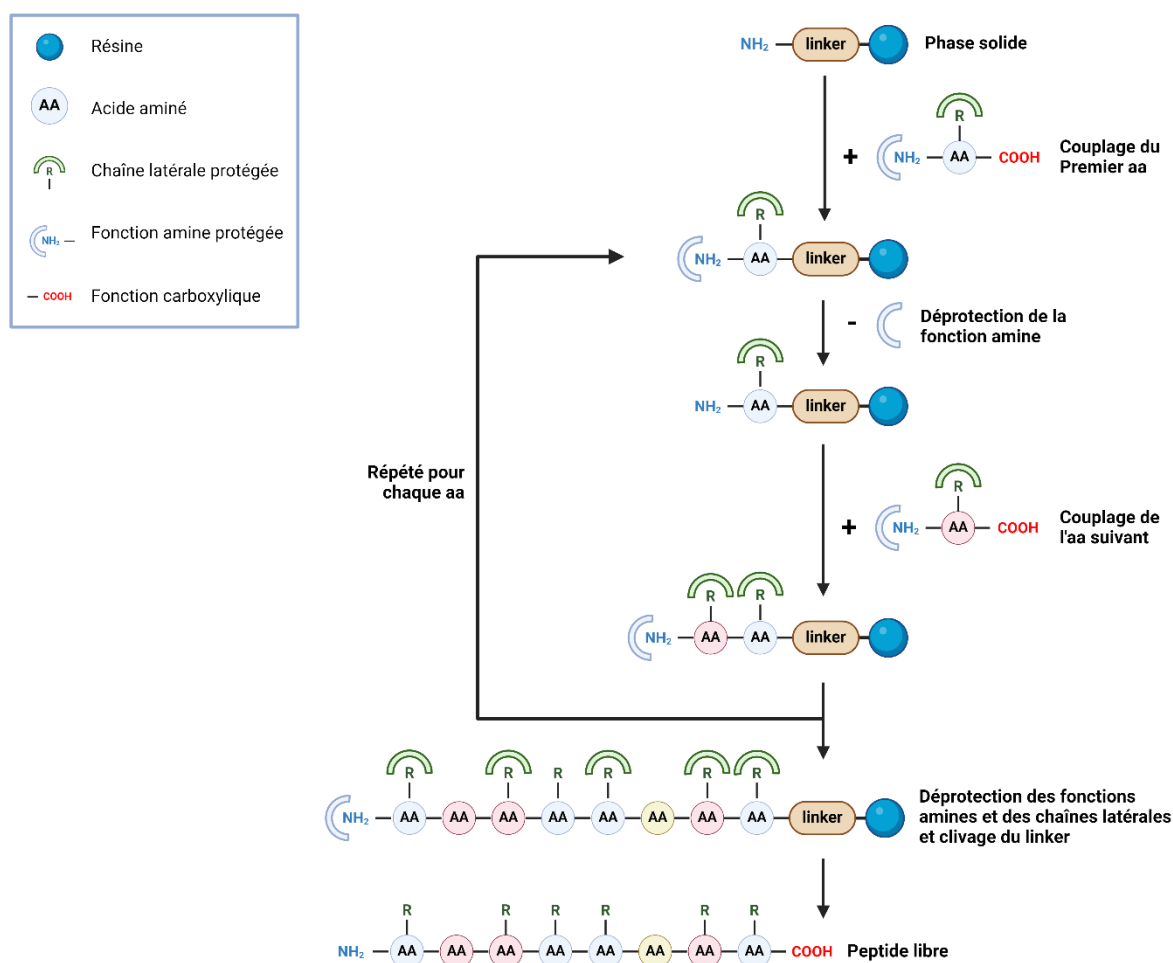


Figure 12 : Stratégie de synthèse de peptide sur phase solide (SPPS).

Il existe deux stratégies de synthèse peptidiques : la stratégie Boc (*t*-butyloxycarbonyl) et la stratégie Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl), du nom des groupements protecteurs qui permettent le masquage de la fonction amine reliée au carbone α (**Figure 13**) [121]. Plus récente, la stratégie Fmoc permet la déprotection de la fonction amine par l'utilisation d'une base faible, la pipéridine, tandis que la stratégie Boc nécessite l'utilisation d'un acide fort, l'acide trifluoroacétique (TFA), composé très corrosif qui peut impacter l'intégrité de la chaîne peptidique lorsqu'il est utilisé à de trop nombreuses reprises au cours des cycles déprotection/couplage [121,121,123]. Préférentiellement, c'est la stratégie Fmoc qui a été adoptée au cours de la synthèse de nos *stapled peptides*. Elle a été utilisée conjointement à l'utilisation de groupes protecteurs Boc, pour masquer les chaînes latérales des lysines, lesquelles contiennent une fonction amine qui ne doit surtout pas être déprotégée au cours des cycles de déprotection/couplage, et *tert*-butyl (tBu) pour masquer les chaînes latérales des sérines.



Figure 13 : Formules des fonctions Boc (à gauche) et Fmoc (à droite).

Ces groupes sont utilisés pour protéger les fonctions aminées des acides aminés dans les stratégies de synthèse sur solide éponymes.

Dans le cadre de la synthèse d'un *stapled peptide*, et plus particulièrement d'un *double stapled peptides*, les acides aminés permettant la mise en place des agrafes nécessitent des groupes protecteurs particuliers. Le procédé utilisé pour la synthèse de nos *stapled peptides* est détaillé plus loin dans ce chapitre. Toutefois, la synthèse de *stapled peptides* nécessite des contraintes supplémentaires, parmi lesquelles le choix des acides aminés àagrafer, le nombre d'agrafes, la nature de la réaction permettant la mise en place de l'agrafe et enfin la nature même de l'agrafe.

Les peptides qui ont été générés sont basés sur la séquence native de la cofiline impliquée dans l'interaction avec LIMK2. Les acides aminés impliqués dans cette interaction ont été déterminés par l'analyse des structures 3D de LIMK2 disponibles et par bio-informatique. Cela a permis de mettre en évidence quels résidus ne devaient surtout pas être impliqués dans l'établissement des agrafes, sous peine d'impacter négativement l'interaction avec LIMK2, et lesquels pouvaient être utilisés sans risque. Ainsi, ce sont les résidus de l'hélice $\alpha 5$ situés sur la face opposée à celle impliquée dans l'interaction avec LIMK2 qui ont été déterminés comme adaptés à la mise en place des agrafes (**Figure 14**).

Comme cela a été évoqué dans le chapitre introductif sur les *stapled peptides*, il existe plusieurs possibilités pour la mise en place des agrafes, faisant varier la longueur de la chaîne entre les deux bras de l'agrafe, eux-mêmes liés de façon covalente aux acides aminés choisis. Nous avons retenu, dans le cadre de ce projet, les stratégies $i, i+4$ (un tour d'hélice) et $i, i+7$ (deux tours d'hélice), cette dernière ayant montré des résultats prometteurs dans la littérature en termes d'hélicité du peptide et de pénétrabilité des cellules [47] (**Figure 14**). De la même manière, l'impact du nombre d'agrafes sur l'hélicité et la rigidité du peptide a été discuté dans le chapitre d'introduction dédié aux *stapled peptides*. Ici, le choix a été fait de synthétiser des *single stapled* et *double stapled peptides* (en conformation *remote* ou *criss-crossed*).



Figure 14 : Design rationnel des *stapled peptides* selon la séquence native de la cofiline.

Les acides aminés impliqués dans l'interaction avec LIMK2 sont spécifiés en **rouge** (ceux cruciaux pour l'interaction), en **orange** (ceux en contact avec LIMK2), en **jaune** (ceux situés du côté de l'hélice en contact avec LIMK2) ou en **vert** (ceux situés de l'autre côté de l'hélice). À droite, modélisation de l'interaction entre l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline et LIMK2. Les acides aminés impliqués dans l'interaction sont indiqués avec le même code couleur. Au-dessus de la séquence, les positions des acides aminés pour le positionnement des agrafes (i, i+4 ou i, i+7) sont également spécifiées. D'après Vincent Aucagne.

La stratégie générale utilisée dans le cadre de ce projet pour mettre au point nos *stapled peptide* est celle utilisant les agrafes cystéine développées par Kumita et al. (2000). Elle tire profit de la réactivité de la fonction thiol des chaînes latérales des cystéines vis-à-vis d'un *bis*-électrophile, ce qui rend la réaction d'addition de l'agrafe très sélective en plus d'être réalisable à pH physiologique [53]. En outre, cette stratégie est compatible avec de nombreuses agrafes commerciales, de nature chimique variée, à la fois en i, i+4 et i, i+7. Elle nécessite toutefois la mutation de plusieurs des résidus du peptide en cystéines ou D-cystéines.

Dans le cas d'un *single stapled peptide*, la réaction entre le thiol des chaînes latérales des cystéines et le *bis*-électrophile a lieu après la déprotection des chaînes latérales et le clivage du peptide de la résine. Dans ce cas, la déprotection des thiols s'effectue de façon simultanée avec le reste des chaînes latérales, ce qui implique l'utilisation d'un groupe protecteur compatible avec le traitement au TFA, par exemple le S-trytil (Trt) [124]. Dans le cas d'un *double stapled peptide*, cette fois, les réactions de conjugaison se font de façon séquentielle. Les deux paires de cystéines sont donc protégées par des groupes protecteurs dont la labilité est différente et les déprotections ne surviennent pas de façon simultanée. Dans le cadre de la synthèse de nos *stapled peptides*, les deux groupes protecteurs choisis sont les groupes Trt et S-acetamidométhyl (Acm) [124]. Après la fin de la synthèse peptidique, le traitement au TFA permet le retrait des groupes protecteurs labiles en conditions acides (Boc, tBu et Trt) et le clivage du *linker*, donc la libération du peptide néo-synthétisé [123]. Après la mise en place de la première agrafe, les groupes protecteurs Acm sont enlevés par traitement à l'iode en conditions réductrices. La mise en place de la seconde agrafe peut alors avoir lieu. Enfin, le peptide est purifié par HPCL (**Figure 15**).

Nom du peptide	Activité (32P)	Localisation sur la cofiline	Nombre d'acides aminés	1ère cystéine	2ème cystéine	Séquence du peptide	Type d'agrafe
CofiPep 00-1	Inactif	[110-128]	19	Aucune	Aucune	Ac- PLKSKMIYASSKDAIKKKL -NH2	Pas d'agrafe
CofiPep 00-2	Inactif	[110-121]	12	Aucune	Aucune	Ac- PLKSKMIYASSK -NH2	Pas d'agrafe
CofiPep 11-1	++	[110-121]	12	S113	Y117	Ac- PLK C KMI C ASSK -NH2	m -xylylene
CofiPep 12-1	++	[110-128]	19	S113	Y117	Ac- PLK C KMI C ASSKDAIKKKL -NH2	m -xylylene
CofiPep 12-3	Inactif	[110-128]	19	S113	Y117	Ac- PLK C KMI C ASSKDAIKKKL -NH2	p -xylylene
CofiPep 12-4	++	[110-128]	19	S113	Y117	Ac- PLK C KMI C ASSKDAIKKKL -NH2	p -tetrafluorophenylene
CofiPep 91-1	Inactif	[110-128]	19	Y117	I124	Ac- PLKSKMI C ASSKDA C KKL -NH2	p -biphenyldimethylene
CofiPep 91-2	Inactif	[110-128]	19	Y117	I124	Ac- PLKSKMI C ASSKDA C KKL -NH2	p -octafluorobiphenylene
COFpep-003	++	[110-121]	12	K114	A118	Ac- PLKS C MI C SSK -NH2	m -xylylene
COFpep-008	++	[110-120]	11	S113/K114	Y117/A118	Ac- PLK C C MI C SSK -NH2	m -xylylene x2
COFpep-009	++	[110-128]	19	S113/K121	Y117/K125	Ac- PLK C KMI C ASS C DAI C KKL -NH2	m -xylylene x2
COFpep-010	++	[110-118]	9	K114 (D-Cys)	Y117	Ac- PLKS c MI C AISK -NH2	disulfide
COFpep-015	++	[113-121]	9	S113	Y117	Ac- C KMI C ASSK -NH2	m -xylylene

Table 5 : Stapled peptides synthétisés dans le cadre de ce projet de thèse.

La localisation sur la cofiline, le nombre d'acides aminés, les positions des acides aminés mutés en cystéine, la séquence du peptide et le type d'agrafe sont spécifiés. L'activité du peptide sur LIMK2, déterminé par test de phosphorylation in vitro, est également indiquée. **Inactif** désigne des peptides sans efficacité et ++ désigne les peptides très efficaces sur l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline par LIMK2. Dans la séquence du peptide, la première paire de cystéines mutées est surlignée en orange. La seconde paire de cystéines mutées est surlignée en rouge pour les double stapled peptides.

II.3.2 Test de phosphorylation in vitro

Par test de phosphorylation in vitro au γ -[^{32}P] ATP, j'ai évalué la capacité de nos peptides à inhiber la phosphorylation de la cofiline par LIMK2. Pour ce faire, les peptides ont été incubés en présence de LIMK2 immunoprécipitée et de la cofiline purifiée, préalablement à l'ajout de γ -[^{32}P] ATP. Deux tendances se sont dégagées de nos tests :

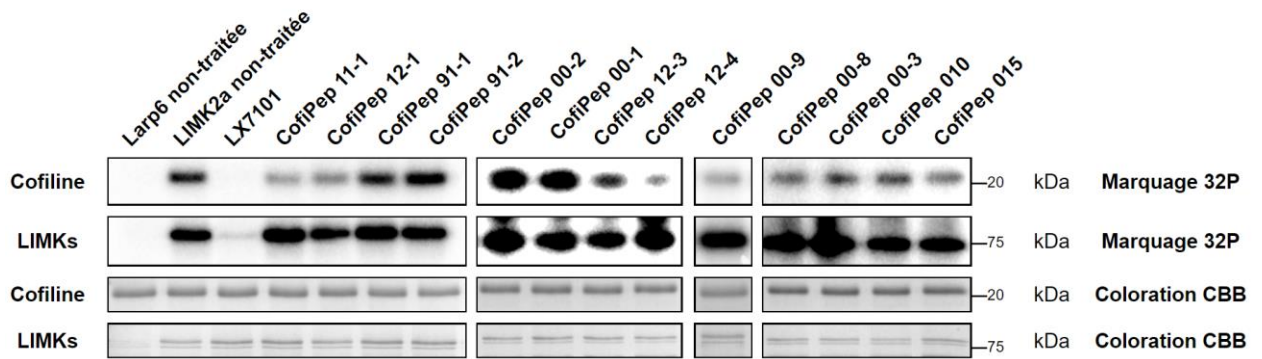
Cinq peptides n'ont démontré aucune capacité à inhiber l'activité de LIMK2. C'est le cas des peptides linéaires CofiPep 00-1, CofiPep 00-2, et des *single stapled peptides* CofiPep 91-1, CofiPep 91-2 et CofiPep 12-3 (**Figure 16A et 16B**).

Huit peptides ont montré une efficacité importante à inhiber l'activité de LIMK2, laquelle se situe en-dessous de 60%. Ce sont les *single stapled peptides* CofiPep 11-1, CofiPep 12-1, CofiPep 12-4, COFpep-003, COFpep-010, COFpep-015 et les *double stapled peptides* COFpep-008 et COFpep-009 (**Figure 16A et 16B**).

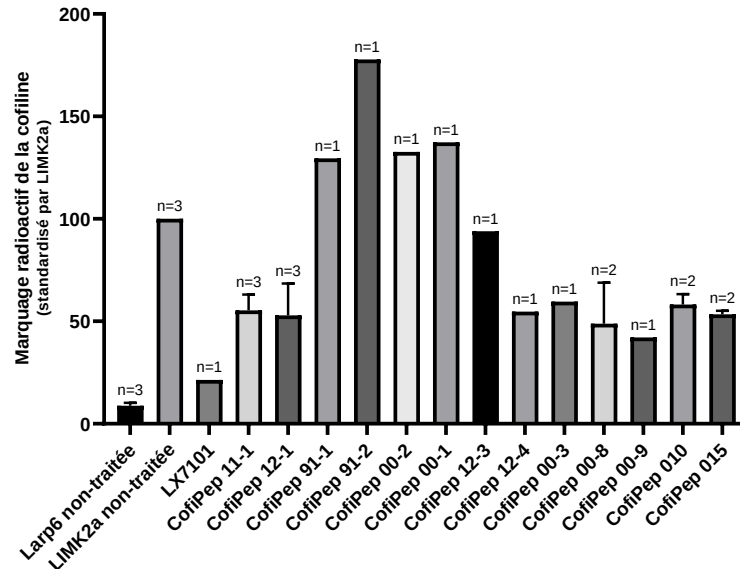
De façon particulièrement intéressante, aucun de ces peptides n'a eu d'impact sur la phosphorylation de LIMK2, contrairement au composé LX7101 qui a contribué à la diminuer fortement (~20% de phosphorylation au lieu de ~90-100%) (**Figure 16C**). Nos peptides inhibent donc spécifiquement la phosphorylation de la cofiline par LIMK2 sans affecter l'activité kinase de cette dernière.

Certaines de ces mesures n'ont été réalisées qu'une seule fois. Cependant, ces résultats donnent une bonne vue d'ensemble des peptides sur lesquels il peut être intéressant d'effectuer des analyses plus approfondies.

A)



B)



C)

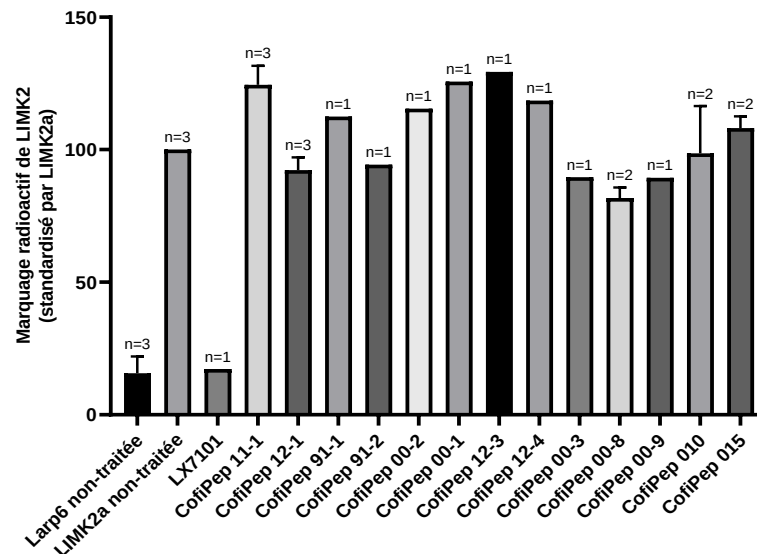


Figure 16 : Huit stapled peptides inhibent efficacement l'activité de LIMK2a sur la cofiline.

Les cellules HEK-293 ont été transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la protéine HA-LIMK2a sauvage. La protéine HA-Larp6 a été utilisée comme contrôle négatif. Les protéines taguées HA sont immunoprécipitées et incubées avec la cofiline recombinante 6-his en présence de 1 μ L de différents stapled peptides. L'ensemble a ensuite été incubé avec du [γ - 32 P] ATP pendant 20 mn à 30°C. Les protéines sont séparées par gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie (CBB) puis révélées par autoradiographie. La phosphorylation de la cofiline par LIMK2a sauvage a été normalisée à 100. La phosphorylation de LIMK2a sauvage a été normalisée à 100. Les colorations au CBB et les autoradiographies sont présentées en A). La quantification relative de la phosphorylation de la cofiline par LIMK2a en absence ou en présence de stapled peptides est montrée sur le graphique B). La quantification relative de la phosphorylation de LIMK en absence ou en présence de stapled peptides est présentée sur le graphique C).

II.3.3 Analyse de l'hélicité des peptides synthétisés par dichroïsme circulaire

L'utilisation de *stapled peptides* en tant que stratégie thérapeutique repose sur les propriétés biologiques des hélices α en matière de perméabilité membranaire, de stabilité et, dans le cas précis de l'inhibition de l'interaction protéine/protéine LIMK/cofiline, de son affinité avec la protéine [55]. De fait, il apparaît crucial de pouvoir évaluer l'hélicité des peptides qui ont été synthétisés pour déterminer s'il est nécessaire d'améliorer leur propension à adopter une conformation hélicoïdale. Si elle ne donne pas des renseignements précis sur la structure des peptides comme pourraient le faire la cristallographie aux rayons X ou la RMN, le dichroïsme circulaire (CD) est une méthode de spectroscopie rapide et efficace pour l'analyse des structures secondaires des polypeptides [125]. Elle repose sur la génération d'un faisceau de lumière E polarisée circulairement. Cette polarisation entraîne la division du faisceau en deux entités qui vont tourner dans des sens opposés (une à droite E_D et une à gauche E_G) [125,126] (**Figure 17**). Lors du passage du faisceau polarisé au travers d'un échantillon, ces deux entités peuvent :

- Ne pas être absorbées ou être absorbées de manière identique ; dans ce cas, l'onde restituée sera polarisée linéairement et l'échantillon sera considéré comme optiquement inactif (non-chiral) (**Figure 17A**) [125,126].
- Être absorbées de façon différentielle, l'une étant plus absorbée que l'autre ; dans ce cas, l'onde restituée sera elliptiquement polarisée et l'échantillon sera considéré comme optiquement actif (chiral) (**Figure 17B**) [125,126].

Le spectre dichroïque, exprimé en ellipticité molaire $[\theta]$ ($\text{deg}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), correspond à la différence d'absorbance entre ces deux composantes à une longueur d'onde donnée, laquelle dépend elle-même de l'échantillon testé. Par exemple, l'UV lointain (190 à 240 nm) permet de caractériser qualitativement et quantitativement les structures secondaires des polypeptides (hélice α , feuillet β , tours et structures désordonnées), grâce à la liaison peptidique qui agit comme un chromophore [125–127]. L'UV proche (250 à 290 nm) va plutôt permettre de donner des informations sur la structure tertiaire des polypeptides, notamment grâce aux chaînes latérales des résidus aromatiques et donc de déterminer l'environnement de ces acides aminés [125,126].

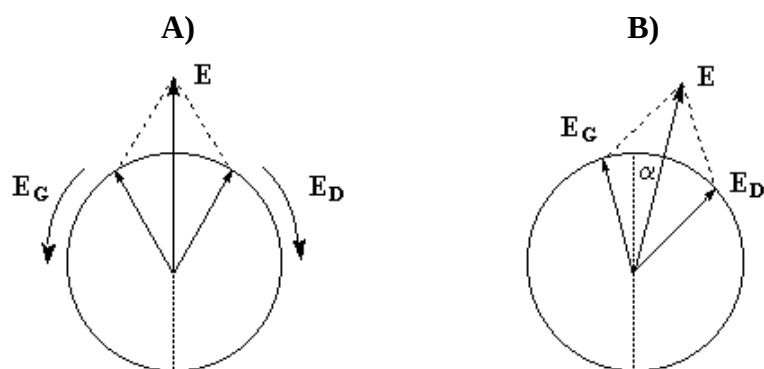


Figure 17 : Principe du dichroïsme circulaire.

En **A)** les composantes E_G et E_D passe au travers d'un échantillon optiquement inactif, la résultante est un faisceau E polarisé linéairement. En **B)** les composantes E_G et E_D passe au travers d'un échantillon optiquement actif, la résultante est un faisceau E polarisé elliptiquement selon un angle α (exprimé en degré). Figure adaptée de Brittain (1999).

Les structures secondaires des polypeptides présentent des signatures dichroïques bien particulières. Les hélices α , notamment, sont particulièrement bien caractérisées en CD ce qui est un argument supplémentaire pour l'utilisation de cette technique dans le cadre de notre étude. Par ailleurs, le spectre dichroïque de l'hélice α est presque indépendant de la nature des chaînes latérales et du solvant utilisé. Enfin, les hélices α ont une signature spectrale particulièrement bien caractérisée en dichroïsme circulaire, avec un maximum autour de 190 nm et deux minimums respectivement à 208 et 222 nm (**Figure 18**) [128].

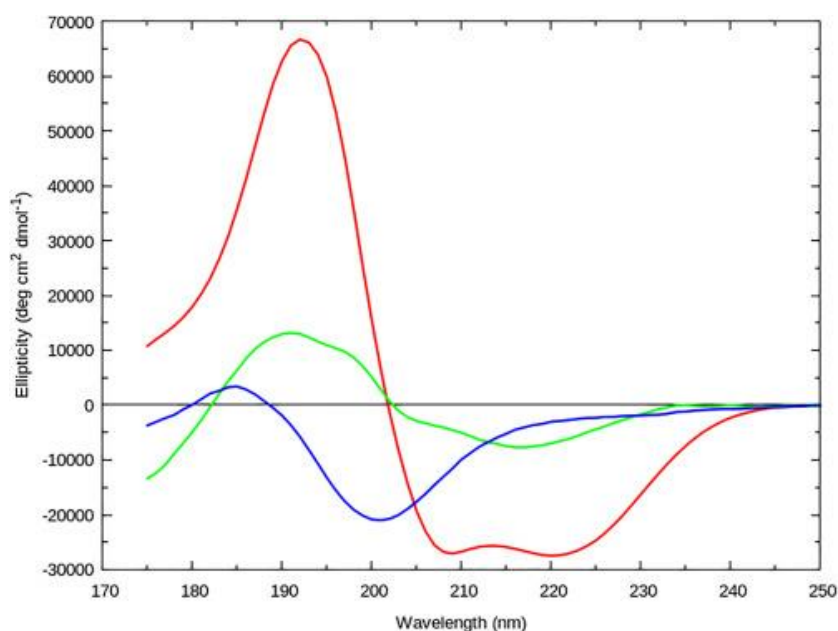


Figure 18 : Spectre dichroïque de trois structures secondaires peptidiques.

En **rouge**, le spectre dichroïque d'un peptide majoritairement composé d'hélice α . En **vert**, le spectre dichroïque d'un peptide majoritairement composé de feuillets β . En **bleu**, le spectre dichroïque d'un peptide conformé en pelote aléatoire. Figure reprise de Rogers et al. (2019).

Le spectre dichroïque d'un échantillon est une combinaison linéaire des différents signaux obtenus par détection des structures secondaires. Les données expérimentales obtenues peuvent être analysées de plusieurs façons. Dans le cas de polypeptides majoritairement composés d'un type particulier de structure (par exemple l'hémoglobine, majoritairement composé d'hélices α), le spectre dichroïque peut simplement être comparé à des spectres de référence pour la structure en question. Dans le cas de polypeptides plus complexes, comportant plusieurs structures secondaires différentes, il est possible de réaliser des analyses plus poussées, quantitatives, par déconvolution du spectre dichroïque. Cette dernière analyse permet notamment de déterminer le pourcentage de chacune des structures secondaires des protéines à l'aide d'un ensemble de protéines dont les structures ont été bien caractérisées [125]. L'analyse par déconvolution a été choisie dans le cadre de cette étude, puisqu'elle permet de déterminer le pourcentage d'hélicité du peptide tout en prenant en compte l'effet de l'agrafe sur le spectre dichroïque. Certains peptides ont été analysés en dichroïsme circulaire par Vincent Aucagne. Les résultats sont présentés **Figure 19**.

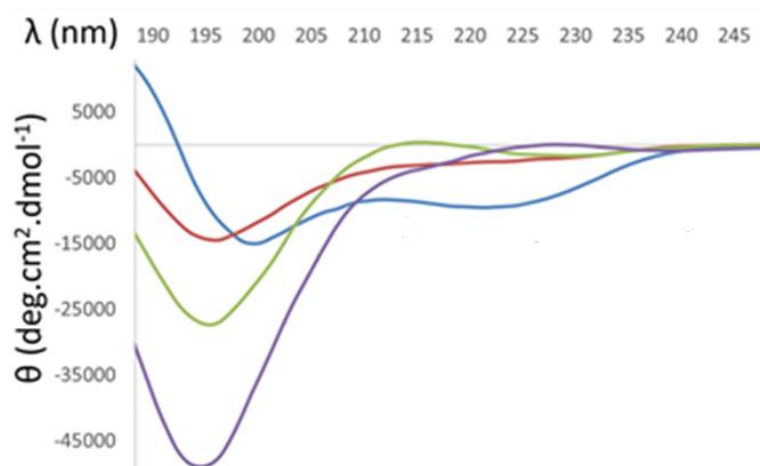


Figure 19 : La mise en place d'une double agrafe augmente l'hélicité du des stapled peptides.
Spectres en dichroïsme circulaire de deux single stapled peptides (*CofiPep 12-1* en vert et *CofiPep 12-3* en rouge), d'un double stapled peptide (*COFpep-009* en bleu) ainsi que d'un peptide linéaire reprenant la séquence de la cofiline en violet. Figure adaptée d'après Vincent Aucagne.

Les single stapled peptides et le peptide linéaire ne présentent pas le profil typique d'une hélice α , avec un maximum autour de 190 nm et un minimum autour de 195 nm correspondant à une structure peptidique désordonnée [129]. En revanche, le double stapled peptide présente un minimum autour de 200 nm et un autre autour de 222 nm, ce qui correspond à ce qui est observé classiquement en dichroïsme circulaire pour les

peptides adoptant une conformation hélicoïdale. Ces exemples mettent en évidence l'importance de la double agrafe pour une meilleure hélicité du peptide.

II.3.4 Imagerie en microscopie

Les LIMKs sont des cibles thérapeutiques intéressantes mais pour lesquelles aucun inhibiteur n'a jusqu'à présent passé le stade des essais cliniques [6]. Ainsi, le développement des *stapled peptides* ciblant l'interaction entre LIMK et cofiline vient avant tout répondre à un besoin dans le domaine thérapeutique. Or, les tests d'activité que nous avons menés jusqu'alors dans le cadre de ce projet ne rendent pas nécessairement compte de la réalité biologique de l'utilisation de peptide en tant que molécule inhibitrice. Les peptides sont confrontés à des limitations supplémentaires par rapport aux petites molécules chimiques, au nombre desquelles la perméabilité membranaire, la stabilité et la biodisponibilité [37,39,44]. L'ajout de l'agrafe rend les *stapled peptides* plus résistants à la protéolyse, et leur permet une meilleure pénétrabilité [47], mais il reste des challenges à surmonter dans le développement de peptide-inhibiteurs. Or, les tests que nous avons réalisés jusqu'alors ont été effectués *in vitro*, directement sur des lysats cellulaires ou sur des protéines immunoprécipitées. Dans ces conditions, les protéines étaient disponibles pour interagir le peptide, lui-même rajouté extemporanément au lysat. Il semble donc nécessaire de pouvoir également vérifier l'efficacité de ces peptides à passer la barrière membranaire. Béatrice Vallée a testé la capacité de certains peptides à traverser la membrane cellulaire.

Pour ce faire, des cellules HeLa ont été incubées avec le CofiPep 11-1, lequel a donné des résultats prometteurs en test de phosphorylation *in vitro*, à 25µM pendant 2 heures à 37°C sous CO₂. Ce peptide a été fusionné avec le fluorophore isothiocyanate (FITC) pour permettre son suivi en microscopie à fluorescence. Après incubation, les cellules vivantes ont été lavées deux fois avec du PBS puis remises en milieu DMEM et observées par vidéo-microscopie sur Carl Zeiss Axio Observer Z7 (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany). Les résultats semblent indiquer que le CofiPep 11-1 est effectivement capable de pénétrer les cellules, ce qui est d'autant plus encourageant que ce peptide a obtenu de bons résultats en test de phosphorylation *in vitro*. Le marquage ne semble pas diffus dans tout le cytoplasme, mais plutôt concentré dans un compartiment qui pourrait être le noyau (**Figure 20**). Pour vérifier cette hypothèse, un co-marquage avec du Hoechst devra être réalisé.

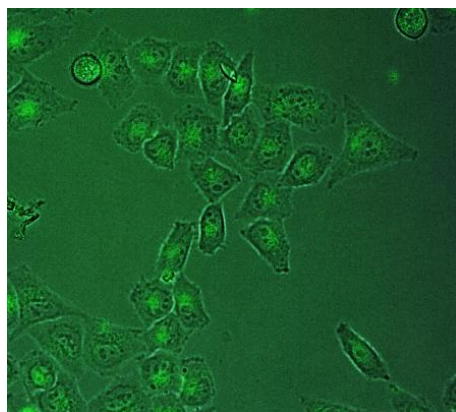


Figure 20 : Le peptide FITC-CofiPep 11-1 est capable de passer la barrière membranaire des cellules HeLa. Le peptide FITC-CofiPep 11-1 est incubé pendant 2 heures à 37°C avec des cellules HeLa. Les cellules HeLa sont alors lavées deux fois au PBS puis remises en milieu DMEM. Les cellules vivantes sont alors observées au vidéo-microscope. D'après Béatrice Vallée.

II.4. Conclusion du chapitre II

Près de vingt ans après le développement du premier inhibiteur petite molécule des LIMKS, LIMKi3/BMS5, les LIM kinases restent des protéines pour lesquelles aucune molécule inhibitrice n'a passé le stade des essais cliniques en vue d'une mise sur le marché. Puisque les inhibiteurs qui ciblent leur site actif ne permettent pas d'aller vers des essais thérapeutiques, il semble nécessaire de mettre au point des modes d'inhibition originaux, sélectifs et efficaces dans l'espoir de débloquent le verrou thérapeutique existant autour de ces kinases. Nous avons tenté de répondre à cette problématique par le développement de *stapled peptides* visant à inhiber spécifiquement l'interaction entre les LIMKs et leur principal substrat, la cofiline. Les données préliminaires de ce projet ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe « Protéines de Synthèse et Chimie Bioorthogonale » du CBM dirigée par Vincent Aucagne. Elles ont mis en évidence qu'il était possible de développer des peptides cyclisés pour inhiber spécifiquement l'interaction entre la cofiline et les LIMK, ce qui n'avait jamais été réalisé jusqu'alors.

Plusieurs dizaines de peptide ont été synthétisés dans le cadre de ce projet, couvrant ainsi une large variété de constructions aux propriétés chimiques différentes. Pour générer cette diversité, plusieurs caractéristiques des peptides ont été modifiées, au nombre desquelles i) la longueur du peptide, ii) le choix des acides aminés substitués en cystéine pour établir l'agrafe, iii) l'espacement entre les cystéines mutées (i , $i+4$, i , $i+7$, i , $i+3$, i , $i+11...$), iv) le nombre d'agrafe, v) l'agencement des double agrafes (*remote*, *stitched*, *criss-crossed...*), v) la nature de l'agrafe (*m-xylylène*, *disulfide*, *p-tetrafluorophenylène...*). Il existe de nombreuses agrafes commerciales compatibles avec la réaction thiol-

électrophile à la base de la méthode choisie pour accrocher l'agrafe sur nos peptides, ce qui permet de changer rapidement et simplement la nature chimique de l'agrafe. Les autres caractéristiques sont déterminées directement lors de la synthèse sur phase solide.

Parmi les peptides qui ont été synthétisés, treize ont été testés pour leur activité sur LIMK2 par test de phosphorylation *in vitro*. Dans le cadre du projet, j'ai été en charge de réaliser ces tests. J'ai mis en évidence deux catégories de peptides : ceux qui étaient inefficaces et ceux qui montraient une efficacité pour inhiber la capacité de LIMK2 à phosphoryler la cofiline. Parmi les peptides inefficaces, nous avons pu mettre en évidence que les peptides *non-stapled* (linéaires) ne présentaient aucune activité sur LIMK2, mettant en évidence que l'agrafe était absolument nécessaire pour assurer l'efficacité d'inhibition du peptide. Le peptide CofiPep 12-3 ne présentait pas non plus d'activité sur LIMK2. Ce peptide ne diffère de CofiPep 12-1 (qui, lui, est actif) que par la nature de son agrafe : *p*-xylylène au lieu de *m*-xylylène. Les préfixes *p*- et *m*- font référence à la nomenclature des dérivés benzéniques et aux positions *para*- ou *méta*- sur lesquels viennent se fixer les substituants autres que l'hydrogène sur un hydrocarbure aromatique. Il est possible que le changement de position (*para* au lieu de *méta*) des substituants ait entraîné un changement de conformation de l'agrafe qui a nui à l'efficacité du peptide, par exemple en induisant un encombrement stérique. Enfin, les CofiPep 91-1 et 91-2 sont les deux autres peptides qui se sont avérés inefficaces pour inhiber LIMK2. Ces peptides diffèrent par la nature de leurs agrafes (*p*-biphenyldimethylene et *p*-octafluorobiphenylene respectivement), mais ce sont également les deux seuls peptides pour lesquels a été utilisé un espacement de type *i*, *i*+7 et les seuls pour lesquels on a substitué la tyrosine 117 et de l'isoleucine 124. Sans analyse complémentaire, il est impossible de déterminer quel rôle a joué l'une ou l'autre de ces caractéristiques dans l'activité du peptide. Les huit autres *stapled peptides* (CofiPep 11-1, CofiPep 12-1, CofiPep 12-4, COFpep-003, COFpep-008, COFpep-009, COFpep-010, COFpep-015), qui varient tant en longueur, qu'en nombre d'agrafes, en espacement ou encore en nature de l'agrafe, ont montré une bonne efficacité pour inhiber la phosphorylation de la cofiline par LIMK2 et constituent des bases de travail pour l'élaboration et l'optimisation de la génération suivante de *stapled peptides*. De façon particulièrement intéressante, aucun de ces peptides n'a inhibé la capacité de LIMK2 à s'autophosphoryler. Or, l'autophosphorylation des LIMKs est un mécanisme essentiel à leur activation et à leur stabilité, comme cela a été évoqué au cours du chapitre I des Résultats. Par ailleurs, on peut émettre l'hypothèse que les *stapled peptides* que nous avons

synthétisés, puisqu'ils ciblent l'interaction protéine-protéine entre les LIMKs et leur substrat, sont spécifiques de la phosphorylation de la cofiline par les LIMKs et qu'ils n'auront pas d'effet sur d'autres partenaires ou substrat des LIMKs.

L'hélicité de certains des peptides a été testée en dichroïsme circulaire. Cela a permis de mettre en évidence que les peptides qui n'étaient pas agrafés, et demeuraient donc linéaires, ne présentaient pas le profil-type d'une hélice α . Les peptides CofiPep 12-1 et CofiPep 12-3 présentaient un profil intermédiaire, où les courbes présentaient bien les deux minimums caractéristiques du spectre de l'hélice α en dichroïsme circulaire, mais pas aux bonnes longueurs d'onde (195 nm et 230 nm, respectivement). Enfin, le peptide *double stapled* COFpep-009 présente un profil extrêmement proche de ce qui est attendu pour un peptide structuré en hélice α , avec un maximum autour de 190 nm et deux minimums autour de 208 nm et de 220 nm. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui corrélient le nombre d'agrafes et l'hélicité des *stapled peptides*. Là encore, ce sont des données très encourageantes pour le développement de peptides inhibiteurs, puisque l'on sait que l'hélicité du peptide va permettre une meilleure résistance à la protéolyse, perméabilité membranaire et affinité pour sa cible.

Enfin, l'étude par microscopie à fluorescence a permis de mettre en évidence que le peptide FITC- CofiPep 11-1 était capable de passer la barrière membranaire des cellules HeLa. Les images suggèrent que le peptide n'est pas diffus dans tout le cytoplasme mais localisé dans un compartiment cellulaire qui pourrait être le noyau. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser un co-marquage avec par exemple du Hoechst qui se localise précisément dans le noyau des cellules. Les conditions dans lesquelles ont été réalisées les expériences, notamment le fait qu'elles aient été réalisées sur des cellules vivantes et donc sans possibilité de réaliser une analyse par microscopie confocale, ne permettent pas de préciser la localisation cellulaire du peptide (cytoplasme ou noyau). Il faudrait alors envisager des expériences sur cellules fixées avec différents marqueurs de divers compartiments cellulaires. Etant donné que les LIMKs et la cofiline sont localisés dans le cytoplasme et le noyau, la présence du *stapled peptide* (qui ne possède pourtant pas de NLS) dans le noyau n'est pas un problème. Toutefois, cette expérience a offert de précieuses informations sur l'efficacité du peptide à passer les barrières cellulaires, un critère absolument crucial pour permettre son utilisation en tant que molécule thérapeutique. Sans possibilité de passer les membranes cellulaires, le peptide ne peut

jamais atteindre sa cible. Il est donc inutile. D'autres peptides ont depuis été testés, avec des résultats très encourageants, notamment pour le peptide COFpep-009 (données non-montrées).

Les données préliminaires obtenues au cours de cette étude sont extrêmement encourageantes. Elles mettent en évidence l'efficacité de *stapled peptides*, un type d'agent thérapeutique novateur et très prometteur, à empêcher de façon spécifique la phosphorylation par LIMK2 de la cofiline. Cette méthode d'inhibition n'avait encore jamais été mise au point pour ces protéines. Or, les résultats obtenus en test de phosphorylation in vitro, et les données complémentaires en dichroïsme circulaire et microscopie à fluorescence mettent en évidence la pertinence de ce projet.

Le potentiel des *stapled peptides* pour inhiber spécifiquement les LIM kinases est certain et ouvre la voie au développement de thérapies innovantes pour cibler des protéines jusque-là considérées comme « undruggable ».

Discussion et perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai eu l'opportunité d'étudier les LIM kinases sous deux aspects, à la fois différents et complémentaires l'un de l'autre : le fondamental, à travers l'étude moléculaire de ces protéines, et l'appliqué, à travers le développement de thérapies innovantes les ciblant. La discussion sera donc abordée sous ces deux angles.

Etude moléculaire de la régulation de l'activité des LIM kinases

Le cytosquelette est un élément essentiel à l'homéostasie cellulaire, et sa dynamique est au cœur de nombreux phénomènes essentiels à la vie de la cellule. Sans cytosquelette, pas de cycle cellulaire, pas d'apoptose, pas de différenciation ou encore de motilité cellulaire [1]. En tant qu'actrices majeures du remodelage du cytosquelette, les LIM kinases prennent part à ces nombreux processus cellulaires et leur implication a été largement étudiée au cours des trente dernières années [1]. Découvertes respectivement en 1994 et 1995, LIMK1 et LIMK2 appartiennent à de multiples voies de signalisation, les premières décrites étant celles impliquant les GTPases de la famille Rho (**Figure 21**) [30,115]. Leur substrat le plus décrit est la cofiline, un facteur de dépolymérisation (*Actin Depolymerizing Factor*, ADF) de l'actine. En inhibant la cofiline par phosphorylation de sa sérine 3, les LIM kinases vont empêcher le remodelage des filaments d'actine [60]. Il est admis que ces protéines jouent également un rôle dans le remaniement des microtubules, même si leur mode d'action et les voies de signalisation associées restent inconnus à ce jour.

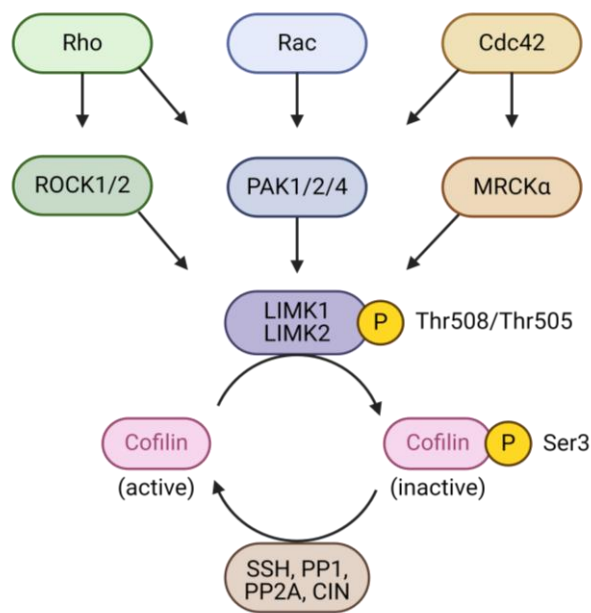


Figure 21 : Régulation de la cofiline par LIMK1 et LIMK2, situées en aval des voies de signalisation des GTPases de la famille Rho.

Figure reprise de Villalonga et al. (2023).

Lorsqu'un acteur aussi important de la vie cellulaire est dérégulé, les systèmes auxquels il prend part le sont aussi. Ainsi, les LIMKs sont impliquées dans de nombreux phénomènes pathologiques au titre desquels le cancer, les maladies neurologiques, les neurofibromatoses ou encore les infections virales [1]. Depuis de nombreuses années, les LIMKs sont considérées comme des cibles pharmacologiques intéressantes, parce qu'elles offrent un espoir thérapeutique pour les pathologiques pour lesquels il n'existe aucun traitement, mais également parce qu'elles pourraient constituer une alternative à certaines des thérapies actuelles [6]. Les thérapies anti-cancéreuses, notamment les taxanes et le cisplatine, ont des effets secondaires qui viennent drastiquement détériorer la qualité de vie des patients et qui peuvent engendrer le développement de résistance tumorale [4,5]. Malheureusement, en dépit de leur potentiel et de plusieurs décennies de recherche, les LIMKs restent aujourd'hui des impasses thérapeutiques pour lesquelles aucun inhibiteur de type « petite molécule chimique » n'a passé le stade des essais cliniques [6].

À ce jour, il reste difficile de faire un état des lieux des raisons pour lesquelles les inhibiteurs des LIMKs ont échoué à aboutir à une mise sur le marché. Certains des résultats obtenus *in vivo* sur des modèles de souris se sont avérés très prometteurs et, malgré cela, ces études n'ont pas ouvert la voie à des essais cliniques [6,106]. Peut-être que le fait de cibler le site actif des LIMK n'est pas une stratégie adaptée à l'inhibition de ces kinases ?

Le substrat principalement décrit des LIMKs est la cofiline, mais l'étude de la littérature a montré que ce n'était pas leur seul substrat et que bien d'autres ont été mis en évidence ces dernières années, dont certains en lien avec le développement de pathologies [1]. Par exemple, la protéine CDK6 est régulée négativement par LIMK1 et LIMK2 [91]. Or, CDK6 est une protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et dont la dérégulation a été associée au développement de cancers. À ce jour, on ignore si les LIMK régulent CDK6 par phosphorylation mais, si c'est le cas, qu'advient-il de cette protéine lorsque l'on inhibe le site actif des LIMK et qu'elles ne sont plus en mesure de la réguler ? Les auteurs ont en partie répondu à cette question, en montrant notamment que l'inhibition de LIMK1 et LIMK2 entraînait une augmentation de l'expression de CDK6 [91]. De la même manière, on ignore toujours de quelle manière les LIMKs régulent le remaniement des microtubules. De fait, on ignore aussi les conséquences que peut avoir leur inhibition sur les processus, absolument cruciaux pour la vie cellulaire, dans lesquels les microtubules sont impliqués [17].

Ainsi, pour espérer comprendre ce qui freine le développement de molécules thérapeutiques ou pour mettre au point des thérapies innovantes qui ciblent les LIMKs de façon spécifique et efficace, il faut aller plus loin dans le détail de leur mécanisme moléculaire de fonctionnement et leur implication. C'est cette problématique qui a constitué le point de départ de mes travaux de thèse, lesquels visaient à étudier en détail la régulation des LIMKs vis-à-vis de leur substrat principal, la cofiline. Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence un mécanisme de régulation inédit des LIM kinases.

Historiquement, il a été montré dès 2001 que les LIMKs sont activées par phosphorylation de leur thréonine 505 pour LIMK2 et 508 pour LIMK1, par différentes kinases de la voie des Rho GTPases (ROCK 1 et 2, PAK1, 2 et 4, MRCK α) [61,68,130,131]. Par la suite, Li et al. ont mis en évidence que la dimérisation et la transphosphorylation des LIMKs ont pour conséquence directe l'augmentation de l'activité et de la stabilité de ces protéines [116].

Au cours de ma thèse, j'ai montré que ces deux processus d'activation sont complémentaires et finement orchestrés dans le temps. La phosphorylation des thréonines 505/508 est nécessaire mais pas suffisante pour assurer une activité kinase optimale des LIMKs sur la cofiline. La dimérisation des LIMKs médiant leur transphosphorylation est

un prérequis nécessaire pour permettre leur activation et leur activité sur la cofiline. Les tyrosines 630/632, de par leur nature aromatique, jouent un rôle clé dans ce processus.

D'autres processus de régulation des LIMKs sont décrits dans la littérature.

En 1996, Hiraoka *et al.*, sous la direction de Kensaku Mizuno (un pionnier très actif dans l'étude des LIMKs), ont décrit que les domaines LIM des LIMKs interagissaient avec leur domaine kinase pouvant ainsi former des dimères en configuration tête-bêche ou des monomères en se repliant sur elles-mêmes. Le rôle fonctionnel de ce processus n'a pas été élucidé à l'époque (**Figure 22**) [132]. Trois ans plus tard, la même équipe de Kensaku Mizuno a mis en évidence que cette interaction domaines LIM/domaine kinase permet en réalité de réguler négativement l'activité kinase de LIMK1. En effet, un mutant tronqué du domaine LIM de LIMK1, Δ LIM-LIMK1, a une activité de phosphorylation de la cofiline exacerbée (3 à 5 fois plus de phosphorylation) par rapport à la protéine sauvage. Par ailleurs, la phosphorylation de la cofiline par LIMK1 est inhibée de façon dose-dépendante par ajout du domaine LIM. Ce mutant Δ LIM-LIMK1 a des effets drastiques sur le cytosquelette d'actine, avec la formation de structures ponctuées. De même lorsque les cystéines des doigts de zinc des domaines LIM sont mutées en glycine, détruisant ainsi la structure tertiaire du doigt de zinc et donc les interactions associées, l'activité kinase de ce mutant sur la cofiline est exacerbée (3 à 7 fois plus de phosphorylation) [133]. La même année, Edwards et al. ont corroboré ces résultats en se concentrant sur l'étude du cytosquelette d'actine. La délétion du domaine LIM perturbe drastiquement le cytosquelette d'actine. Par ailleurs, ils ont aussi montré que le domaine PDZ régulait aussi négativement l'activité des LIMKs sur le remaniement du cytosquelette d'actine, en utilisant un mutant PDZ-GL177EA qui abolit les interactions canoniquement décrites des domaines PDZ avec leurs partenaires [131].

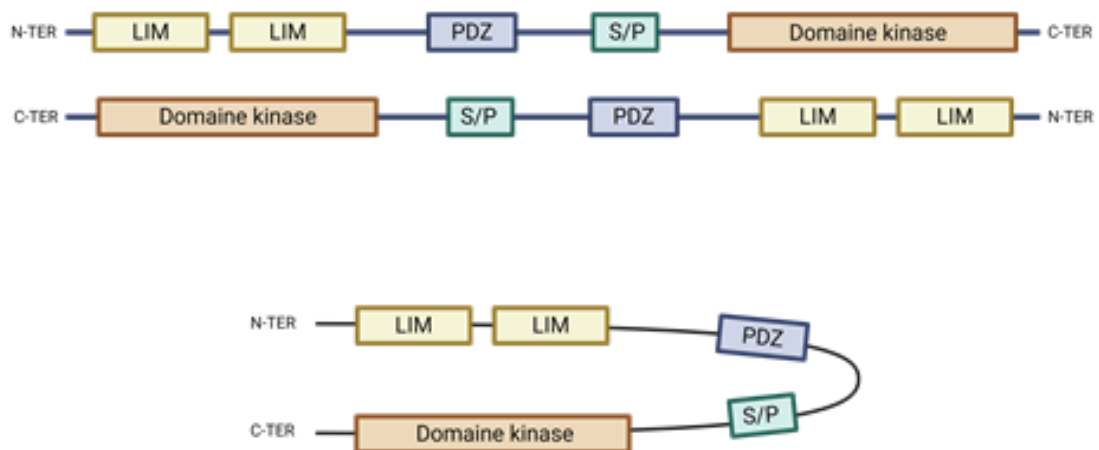


Figure 22 : Les domaines LIM et les domaines kinases sont capables d'interagir l'un avec l'autre.
L'interaction peut s'effectuer via la formation d'homodimères ou par repliement de la protéine sur elle-même. Adapté de Hiraoka et al. (1996).

Très récemment, l'équipe de Titus Boggon, qui avait déjà mis en évidence le mécanisme d'interaction atypique entre le domaine kinase de LIMK1 et la cofiline, a publié une étude structurale très détaillée sur le rôle du domaine PDZ dans l'autoinhibition des LIMKs [134]. Globalement, la conformation du domaine PDZ de LIMK1 et LIMK2 présente un repliement caractéristique des domaines PDZ répertoriés dans la littérature. Cependant, des spécificités ont été mises en évidence. Notamment, la séquence caractéristique des domaines PDZ « x - ϕ - G - ϕ' », où x est n'importe quel résidu et ϕ et ϕ' sont des résidus hydrophobes et qui est impliquée dans leur interaction avec leurs partenaires, est différente. Le premier résidu hydrophobe ϕ est une arginine, qui est tout de même orientée vers le cœur hydrophobe de la protéine ce qui engendre une conformation plus souple de cette zone du domaine PDZ qui perd son potentiel d'interaction [134]. Par ailleurs, cette séquence « x - ϕ - G - ϕ' » correspond au GL177 qu'Edwards et collaborateurs ont muté dans leur étude de 1999 [108], elle joue donc un rôle dans l'autoinhibition des LIMKs. Il serait intéressant de muter l'arginine pour voir son impact sur l'activité de phosphorylation des LIMKs sur la cofiline. De plus, le groupe de Boggon a mis en évidence un groupe de résidus très conservés présents dans trois brins β distincts éloignés de la séquence prédite d'interaction « x - ϕ - G - ϕ' » et formant une zone très conservée à la surface de la protéine. Des mutations ponctuelles de ces résidus conservés exaltent l'activité kinase des LIMKs vis-à-vis de la cofiline dans un test de complémentation chez la levure [134]. Tous ces éléments structuraux insolites confèrent au domaine PDZ des LIMKs une activité d'autorégulation négative de leur activité kinase

vis-à-vis de la cofiline, mais sans élucider clairement un mécanisme moléculaire : repliement de la protéine, problème de stabilité, de solubilité, de structuration... Par ailleurs, on ne sait pas si ces différents paramètres affectent l'activité kinase des LIMKs vis-à-vis d'autres substrats. Les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse mettent à jour un processus similaire de régulation des LIMKs : la mutation d'un acide aminé distant de la boucle d'activation des LIMKs peut avoir un fort impact sur son activation et son activité sur la cofiline.

D'autres résultats du groupe de Boggon sont aussi particulièrement intéressants quant à la régulation des LIMKs. Dans la voie des Rho GTPases, PAK4 phosphoryle LIMK1 sur sa Thr508 activant son activité kinase sur la cofiline. Or, dans la littérature PAK4 phosphoryle très préférentiellement les sérines. En effet, les auteurs ont montré que la substitution de la thréonine 508 de LIMK1 par une sérine donnait un substrat beaucoup plus efficacement phosphorylé. Par ailleurs, la conformation de PAK4 pour reconnaître son site de phosphorylation Thr508 de LIMK1 n'est pas des plus favorables. L'ensemble de ces données suggèrent que la phosphorylation de la thréonine 508 est suboptimale et pourrait constituer un mécanisme de régulation des LIMKs spécifique de la voie Rac/PAK/LIMK [135].

Par ailleurs, Dong et al. (2012) ont montré que l'interaction entre LIMK1 et la protéine Tropomyosin-related Kinase B (TrkB), elle-même induite par la protéine Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), entraîne la dimérisation de LIMK1 [136]. Cette dimérisation permet la phosphorylation de LIMK1, laquelle est indépendante de la fonction kinase de TrkB. Elle permet également sa stabilisation, par la diminution de sa dégradation, ainsi que l'augmentation de son activité kinase sur la cofiline. Les auteurs suggèrent que l'homodimérisation de LIMK1 pourrait induire sa transphosphorylation et donc permettre son activité sur la cofiline [136]. Ces travaux décrivent des mécanismes d'activation des LIMKs similaires à ceux que nous avons mis en évidence dans cette thèse. De façon intéressante, leurs résultats suggèrent que la dimérisation et transphosphorylation de LIMK1 pourrait être induite par l'un de ses partenaires, ce qui n'avait encore jamais été montré auparavant.

D'autre part, les LIMKs sont situées au cœur d'un vaste réseau d'interactions protéine-protéine et la nature de leur interaction avec certains de leurs partenaires n'est pas encore parfaitement élucidée [1]. D'autres partenaires sont en mesure de phosphoryler les

LIMKs, avec pour conséquence la modulation de leur activité. C'est notamment le cas de la protéine AURKA qui phosphoryle LIMK2 sur ses sérine 283, thréonine 494 et thréonine 505 ce qui augmente son activité kinase sur la cofiline, la ségrégue dans le cytoplasme et la stabilise en empêchant sa dégradation via le système ubiquitine/protéasome [117]. Le groupe de Shah a étudié la régulation des LIMKs via le système ubiquitine/protéasome notamment dans le cancer de la prostate [88,89,137,138]. Lim et al. (2007) ont montré que la protéine Parkin, qui agit comme une E3 ubiquitine ligase, permet l'ubiquitination de LIMK1 et une diminution de la phosphorylation de la cofiline dans les cellules BE(2)-M17 dérivées de neuroblastome [102]. Aussi, il serait intéressant d'explorer plus avant le rôle de l'ubiquitination dans la régulation de l'activité des LIMKs.

Nos résultats s'inscrivent parfaitement dans l'ensemble de ces données de la littérature et dans la complexité de la régulation des LIMKs laquelle comporte encore de nombreuses parts d'ombre. Ils apportent une nouvelle pierre à cet édifice en démontrant que la dimérisation et la transphosphorylation des LIMKs est un prérequis à leur phosphorylation sur la thréonine de leur boucle d'activation et à leur activité subséquente sur la cofiline.

Une question reste toutefois en suspens : de quelle manière la dimérisation et la transphosphorylation des LIMKs influencent la phosphorylation de la thréonine 505/508, l'activation des LIMKs et leur activité sur la cofiline ?

Le processus que j'ai mis à jour fait intervenir l'extrémité C-terminale de ces protéines et plus précisément la tyrosine 632/630, un acide aminé situé à l'extrémité de l'hélice α C-terminale des LIMKs, moins de dix résidus avant la fin de leur extrémité C-terminale (**Figure 23**).

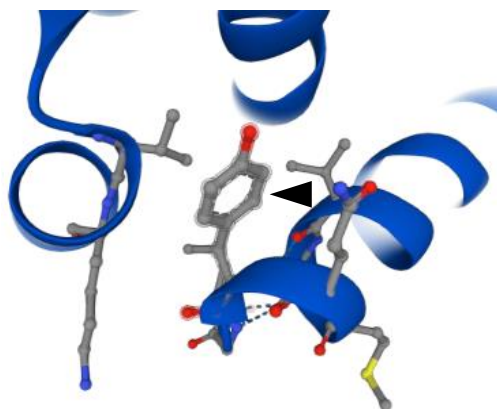


Figure 23 : Représentation 3D de l'extrémité de LIMK2 avec zoom sur la tyrosine 630.
Image générée avec AlphaFold, à partir de sept structures de LIMK2 disponible sur PDB d'après la référence P53671.
La tyrosine 630 est indiquée par une tête de flèche noire.

Le mécanisme moléculaire par lequel agit cet acide aminé dans la dimérisation des LIMK ainsi que l'effet de leur transphosphorylation sur leur activation restent à élucider.

L'analyse des différentes structures des LIMKs présentes dans la PDB par notre collaboratrice Samia Aci-Sèche a mis en évidence que les Y630/Y632 pouvaient adopter deux orientations différentes (**Figure 24**) et qu'il existait une très forte corrélation entre la position de ces tyrosines et la position de l'hélice α C. Or, chez certains kinases, EGFR et B-Raf, cette hélice est connue pour médier des dimérisations [139,140].

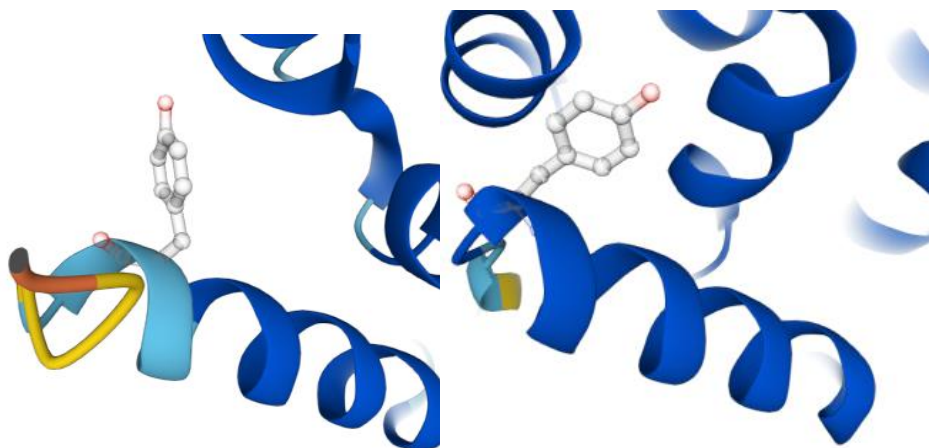


Figure 24 : La tyrosine 632/630 s'oriente différemment sur les structures de LIMK1 et LIMK2.
Image générée avec AlphaFold, à partir de dix structures de LIMK1 disponibles sur PDB d'après la référence P53667 (à gauche) et sept structures de LIMK2 disponible sur PDB d'après la référence P53671 (à droite).

On peut aussi imaginer que la Y632/Y630 jouerait un rôle dans la structure-fonction des LIMKs en assurant le repliement correct de l'extrémité C-terminale de ces protéines et en permettant l'interaction de l'hélice α au bout de laquelle elle se situe (hélice α J) avec

l'hélice α avec laquelle est en contact (hélice αG). Cette structure serait elle-même cruciale pour la dimérisation des protéines, leur transphosphorylation, leur activation et leur activité sur la cofiline. Sur les structures disponibles sur AlphaFold, la Y632 de LIMK1 se situe en face d'une leucine, la L567, tandis que la Y630 de LIMK2 se situe en face d'une valine, la V560 (**Figure 25**). Ces acides aminés sont tous des acides aminés hydrophobes. Or, il est admis que les interactions hydrophobes, et donc ces acides aminés, jouent un rôle crucial dans l'établissement et la stabilité de la structure tertiaire des protéines [141,142]. Il n'est pas impossible d'envisager que la longueur de la chaîne latérale et le cycle aromatique de la tyrosine, que nous avons conservé lorsque nous l'avons muté en phénylalanine mais pas lorsque nous l'avons muté en alanine, joue un rôle dans cette interaction hydrophobe.

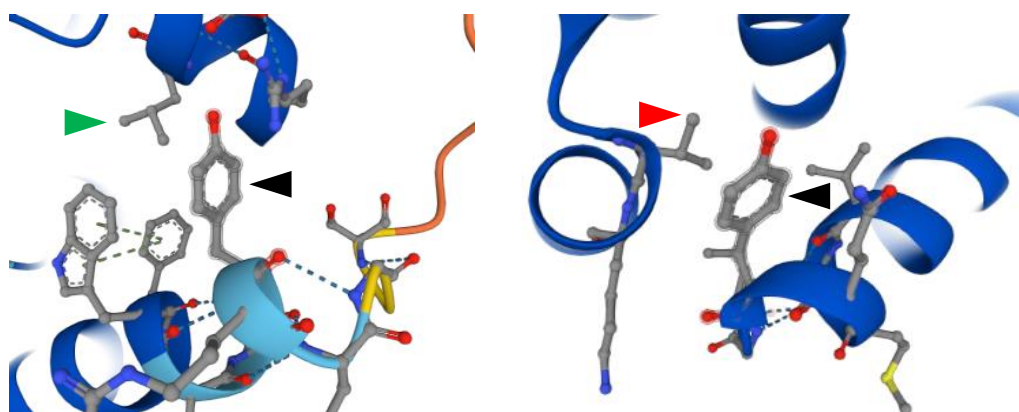


Figure 25 : Représentation 3D de l'extrémité C-terminale des LIMKs avec zoom sur la tyrosine 632/630.
Image générée avec AlphaFold, à partir de dix structures de LIMK1 disponibles sur PDB d'après la référence P53667 (à gauche) et sept structures de LIMK2 disponible sur PDB d'après la référence P53671 (à droite). La tyrosine 630 est indiquée par une tête de flèche noire. La valine 560 est indiquée par une tête de flèche rouge. La leucine 567 est indiquée par une tête de flèche verte.

Au cours de notre étude, nous avons également mis en évidence que la transphosphorylation était un processus indispensable à l'activation de la protéine. La question que l'on peut se poser est la suivante : est-ce que la transphosphorylation des LIMKs pourrait avoir un impact sur leur structure et leur activation subséquente ? Il a été décrit dans la littérature que les modifications post-traductionnelles, et plus particulièrement la phosphorylation, étaient capables d'induire des changements structuraux à l'échelle locale (6 Å) et globale d'une protéine [143,144]. Il est donc tout à fait possible d'envisager que la transphosphorylation des LIMKs entraînerait un changement de structure des LIMKs, et ce changement serait d'autant plus important que le nombre de résidus phosphorylés augmente. Ce changement de structure serait nécessaire pour permettre leur activité sur la cofiline en rendant par exemple accessible la T505 pour

permettre sa phosphorylation et l'activation subséquente de la protéine ou en levant l'inhibition des domaines LIM et PDZ sur le domaine kinase. La résolution de la structure tridimensionnelle de LIMK2 sauvage et des mutants Y630A/Y630F, avec un focus sur leur extrémité C-terminale pourraient offrir de pistes de réflexion sur le rôle de cette tyrosine dans la structuration de l'extrémité C-terminale des LIMKs. Au cours de ma thèse nous avons été en lien Sebastian Mathea du Buchmann Institute for Molecular Life Science à Francfort, cristallographe spécialiste des LIMKs (qui a publié plusieurs structures des LIMKs en complexe avec des inhibiteurs ou la cofiline et avec lequel l'équipe collabore déjà avec Sylvain Routier et Pascal Bonnet dans le cadre des recherches sur la découverte de nouveaux inhibiteurs petites molécules chimiques) dans le but de résoudre ces structures. Nous avons envoyé les plasmides de nos différents mutants. Malheureusement, les travaux de cristallisation n'ont pas abouti.

De la même façon, l'étude en cristallographie aux rayons X du dimère LIMK/LIMK permettrait de mettre lever un certain nombre d'interrogation sur la manière dont les LIMKs interagissent l'une avec l'autre et permettraient de donner des indications sur la localisation des sites possibles de transphosphorylation. Par ailleurs, l'étude phosphoprotéomique, et la mise en évidence de ces sites, est une étape indispensable à la compréhension du mécanisme de régulation des LIMKs par transphosphorylation. Cette étude en phosphoprotéomique pourrait par ailleurs se confronter à la bioinformatique puisque des études font état de la possibilité de prédire les sites de phosphorylation d'une protéine grâce à l'apprentissage automatique (**Figure 26**) [145–147].

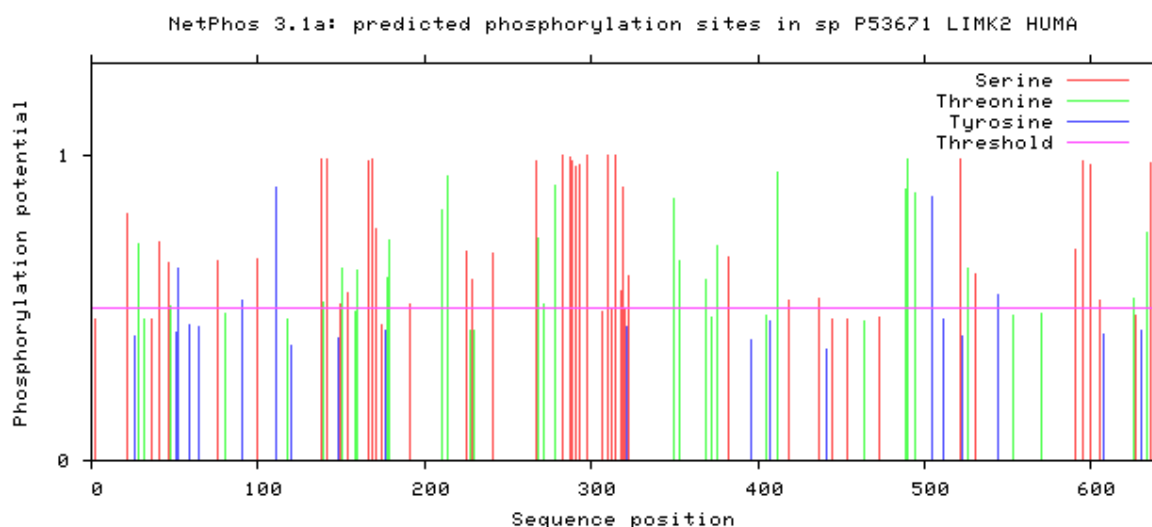


Figure 26 : L'outil NetPhos permet de faire des prédictions des sites de phosphorylation possibles de LIMK2.

Enfin, de façon tout à fait intéressante, j'ai pu montrer que ce processus était spécifique de la phosphorylation de la cofiline. En effet, les mutants de LIMK non-actifs sur la cofiline sont toujours en mesure de phosphoryler MBP, un substrat universel des kinases. Ce résultat signifie que le site actif de ces protéines est toujours fonctionnel et que la perte d'activité kinase est spécifique de la cofiline. Ainsi, non seulement ces résultats ont permis de mettre en lumière un nouveau mode d'activation des LIM kinases, préalable à la phosphorylation de la T505 et indépendant d'elle, mais ils ont également mis en évidence que la phosphorylation de la cofiline passait peut-être par un mécanisme spécifique qui n'était pas partagé par les autres substrats des LIMKs. Un résultat d'autant plus intéressant qu'il pourrait permettre de mettre au point des inhibiteurs spécifiques de la voie de signalisation LIMK/cofiline, impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine, et ce sans impacter les autres partenaires de LIMK et des potentielles voies de signalisation associées.

Mes résultats ont permis de répondre à certaines questions concernant la régulation des LIMKs, des kinases très atypiques et fascinantes. Mais le champ d'investigation reste vaste et finalement, suite à mon travail, de nombreuses autres questions se posent encore.

Vers la mise au point d'une nouvelle méthode d'inhibition des LIM kinases

Nous l'avons vu au cours de la section précédente, il reste des zones d'ombre quant aux déterminants moléculaires nécessaires à l'activité des LIM kinases sur leur substrat, la cofiline. Par ailleurs, ces protéines sont impliquées dans des interactions avec de nombreux partenaires et appartiennent à de multiples voies de signalisation, dont certaines n'ont pas encore été parfaitement élucidées. Dans ces conditions, mettre au point des méthodes d'inhibition originales et spécifiques de la voie LIMK/cofiline peut s'avérer être un véritable défi.

La pierre angulaire du projet « *Stapled Peptides* » est la résolution, en 2016, de la structure en cristallographie du complexe d'interaction entre LIMK1 et la cofiline, et que nous avons décrit en détail dans le paragraphe III de l'introduction. Les auteurs, Hamill et collaborateurs, ont décrit ce mécanisme de reconnaissance comme jamais vu auparavant. En effet, cette interaction très atypique ne repose pas sur la reconnaissance de séquences linéaires situées de part et d'autre du site phosphoaccepteur, ce qui est classiquement observé dans la reconnaissance kinase/substrat. La sérine 3 de la cofiline, située tout au bout de l'extrémité N-terminale de la protéine, est basculée directement dans le site actif sans qu'il y ait de reconnaissance particulière entre les résidus qui l'entourent et le site actif de LIMK1. Le *distal docking* entre le sillon de LIMK1 et l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline ne permet pas seulement une meilleure reconnaissance entre les deux partenaires, comme c'est classiquement le cas pour la reconnaissance entre kinase et substrat, mais prend réellement part au phototransfert en permettant la bascule de la sérine 3 dans la bonne position, au cœur du site actif de LIMK1. C'est cette interaction très atypique, et notamment l'implication particulière de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline, qui a fait naître l'idée de mettre au point des *stapled peptides* pour inhiber spécifiquement l'interaction entre les LIMKs et la cofiline.

Les *stapled peptides* sont des peptides courts (10 à 20 acides aminés) dont certains des acides aminés sont modifiés afin d'introduire une agrafe ou *staple* qui va les rigidifier, induire leur structuration en hélice α , augmenter leur capacité à traverser les membranes et

leur conférer de meilleures propriétés pharmacologiques, notamment en augmentant leur biostabilité.

La stratégie utilisée pour l'élaboration de ces *stapled peptides* tire profit de la grande réactivité de la fonction thiol des chaînes latérales des cystéines vis-à-vis d'un bis-électrophile. Cette particularité rend la réaction entre la cystéine et l'agrafe très sélective en plus d'être réalisable à pH physiologique et dans des solvants à base d'eau, compatibles avec le vivant [53]. Cette méthode a également l'avantage d'utiliser un acide aminé protéinogène, la cystéine, qui s'incorpore aisément dans une structure peptidique ou polypeptidique (en comparaison d'autres acides aminés non-naturels comme ceux utilisés pour la mise en place des agrafes de type lactame et hydrocarbure) [53]. Toutefois, cette méthode présente également des désavantages. Plusieurs études montrent notamment qu'elle est moins efficace pour stabiliser les hélices α que d'autres méthodes d'agrafage [148–150]. Par ailleurs, la liaison thioether formée entre la cystéine et l'agrafe peut être convertie en sulfoxyde sous certaines conditions (oxydatives, notamment) ce qui peut avoir un impact sur la structure du peptide, en particulier son hélicité et son activité [53,151]. Néanmoins, ce propos est à nuancer. Moiola et al. (2019) avance que cette conversion pourrait par exemple augmenter la solubilité des peptides dans l'eau en changeant leur polarité, ce qui serait un avantage dans le cas de peptides très hydrophobes. Cependant, des données théoriques déterminent que les agrafes de type « cysteine crosslinking » ont un moins bon potentiel de désolvatation que d'autres agrafes (comme les ponts lactames) [151]. Or, la désolvatation est une étape essentielle pour permettre la pénétration d'un composé au travers de la membrane cellulaire [48]. Cette méthode d'agrafage a toutefois l'avantage d'être compatible avec de nombreuses agrafes disponibles dans le commerce, de nature chimique parfois très différente, ce qui permet de générer facilement une grande variété de peptides. À ce titre, Fairlie et Dantas De Araujo (2016) relèvent que la nature chimique de l'agrafe joue un rôle crucial sur les propriétés biophysiques des peptides [53]. Au cours de notre étude, nous avons pu observer que les peptides CofiPep 12-3 et 12-4, qui ne diffèrent que par la nature de leur agrafe (*p*-xylylène et *m*-xylylène, respectivement), ne présentaient pas du tout la même activité sur LIMK2. Ce résultat peut être mis en parallèle d'une autre étude qui fait état d'une observation similaire. Crone et al. (2020) ont généré neuf peptides en changeant la disposition de l'agrafe et son isométrie (*méta*, *ortho* ou *para*). Ils ont montré qu'il existait, pour leurs peptides, une différence significative de constante de dissociation (K_D) avec des agrafes de type cystéine/bis-électrophile dont le noyau

aromatique était en conformation *méta/ortho* ou *para*. De façon très intéressante, les auteurs décrivent que l'agrafe de conformation *p*-xylène diminuait l'hélicité de leurs peptides en dichroïsme circulaire en particulier lorsqu'elle était placée sur la deuxième heptade de la séquence du peptide. Les auteurs en concluent que le *p*-xylène est trop gros pour permettre la formation d'une hélice α idéale [152]. Ces résultats mettent en évidence qu'une attention particulière doit être apportée à la nature de l'agrafe chimique. Outre les données empiriques, une façon de déterminer l'effet d'une agrafe sur la structure du peptide et/ou sa capacité à interagir avec sa cible peut être l'utilisation de la modélisation moléculaire du complexe entre les partenaires peptide agrafé et leur cible.

Parmi les treize peptides testés, cinq peptides (dont CofiPep 12-3) n'ont eu aucun effet sur la capacité de LIMK2 à phosphoryler la cofiline. Les peptides linéaires non-agrafés, CofiPep 00-1 et CofiPep 00-2, n'ont démontré aucune capacité à inhiber LIMK2 dans notre test de phosphorylation *in vitro*. Dissociés du reste de la protéine, et des interactions imposées par la structure tertiaire, les peptides ont tendance à perdre leur conformation native lorsqu'ils sont mis en solution [46]. Ces observations sont à mettre en parallèle des résultats obtenus par Vincent Aucagne en dichroïsme circulaire et qui montrent que les peptides non-*stapled* constitués seulement de la séquence native de la cofiline ne présentent pas le spectre dichroïque typique des hélices α mais une conformation totalement déstructurée [128]. Etant donné l'importance de l'hélice $\alpha 5$ de la cofiline pour son interaction avec LIMK, et au vu des résultats, on peut estimer que la structuration en hélice α des *stapled peptides* est indispensable pour assurer une inhibition efficace des LIMKs. Les peptides CofiPep 91-1 et 91-2 n'ont pas non plus montré de capacité à inhiber l'activité de LIMK2 sur la cofiline. Or, ces peptides sont de type *i, i+7*. Ce résultat est surprenant, parce que la position *i, i+7* est l'une des plus communément utilisées dans le cadre du développement de *stapled peptides* et elle a montré des résultats particulièrement intéressants dans des études précédentes [47,150,153]. Par ailleurs, il est admis que l'isoleucine, parce qu'elle contient un deuxième carbone asymétrique (carbone β), fait partie des résidus qui ont tendance à déstabiliser les hélices α [154]. La substitution I124C devrait, théoriquement, induire une meilleure hélicité du peptide et, potentiellement, une meilleure activité, ce qui va à l'encontre de ce qui a été observé. Néanmoins, ces peptides comportent également des agrafes de nature chimique différente et qui n'ont pas été testées par ailleurs avec d'autres peptides. Il est donc difficile de réellement conclure sur les résultats observés pour les peptides CofiPep 91-1 et 91-2.

Pour ceux qui ont été testés en dichroïsme circulaire, les *single stapled peptides* présentaient une hélicité supérieure aux peptides linéaires. En accord avec les données de la littérature, les peptides *double stapled* présentaient une hélicité encore plus importante, avec un profil dichroïque très proche de ce qui est attendu pour une hélice α [54,55,155]. Il est admis que l'hélicité des peptides est à corréluer avec leur capacité à pénétrer la membrane des cellules [48,156]. Plusieurs peptides, dont le peptide CofiPep 11-1, présenté dans le chapitre III des résultats, ont été fusionnés au fluorophore FITC et testés en microscopie à fluorescence pour leur capacité à pénétrer les cellules. Les résultats obtenus semblent indiquer que certains peptides sont capables de pénétrer la membrane cellulaire de cellules HeLa. Néanmoins, les conditions d'expérience (sur des cellules vivantes, non-fixées, sans marqueur du noyau de la cellule) n'ont pas permis de déterminer avec plus de précision si leur localisation était limitée au cytoplasme ou si le marquage FITC co-localisait avec le noyau de la cellule ou avec un autre compartiment cellulaire. Par ailleurs, il serait intéressant de quantifier la fluorescence des cellules pour évaluer et comparer la capacité des différents *stapled peptides* à pénétrer la membrane plasmique. Une étude complémentaire en cytométrie en flux pourrait permettre de déterminer si les *double stapled peptides* montrent une meilleure capacité à passer la membrane cellulaire que les *single stapled peptides*. Par ailleurs, une étude sur d'autres types cellulaires pourrait s'avérer intéressante. Par exemple, dans le cadre du développement d'un peptide à visée thérapeutique, il pourrait être intéressant d'étudier la pénétrabilité des peptides sur des modèles cellulaires spécifique comme les modèles glioblastomes (par exemple U251 ou U87), cancer du sein (MCF-7) ou neurofibromatoses (CRL-3387), puisqu'on sait que les LIMKs sont impliquées dans le développement de ces pathologies et qu'elles constituent les cibles thérapeutiques d'intérêt.

Huit peptides ont montré une efficacité importante à inhiber l'activité de LIMK2 en test de phosphorylation *in vitro*. Ces mêmes peptides n'ont pas affecté l'autophosphorylation de LIMK2, ce qui signifie que le site actif des LIM kinases est toujours fonctionnel. Nous avons abordé dans la discussion dédiée à l'étude moléculaire des LIMKS que ces protéines étaient impliquées dans de nombreuses interactions protéine/protéine, dont certaines n'ont pas encore été pleinement identifiées, et qu'elles jouent un rôle crucial dans de nombreuses voie de signalisation régulant les processus cellulaires [1]. Dans la plupart des cas, les interactions entre les LIMKs et leurs partenaires font intervenir leur fonction de kinase [1]. Nous avons émis l'hypothèse que cibler le site

actif de ces protéines pouvait être préjudiciable aux fonctions qu'elles exercent au sein de la cellule. Or, nous avons ici des inhibiteurs d'une génération nouvelle qui ne ciblent pas le site actif des LIMKs mais leur interaction spécifique et très atypique avec l'un de leurs partenaires, la cofiline. Les tests de phosphorylation in vitro que j'ai menés ont d'ailleurs montré que la capacité d'autophosphorylation de LIMK2 n'était pas affectée. Quid des autres substrats des LIMKs ? Pour répondre à cette question, nous pourrions réaliser le test de phosphorylation in vitro en présence d'un autre substrat de LIMK. La protéine MBP, par exemple, a permis de montrer au cours de notre étude moléculaire que la mutation de la Y630 en alanine n'affectait pas la capacité de LIMK2 à phosphoryler d'autres cibles que la cofiline. Cette protéine pourrait être utilisée exactement de la même manière mais, cette fois, en présence de nos *stapled peptides*. De cette manière, on pourrait déterminer si l'inhibition de LIMK2 est bien cofiline-spécifique. Par ailleurs, il serait intéressant de tester l'activité des peptides in cellulo, puisque les tests de phosphorylation in vitro, où l'on travaille sur des protéines purifiées/immunoprécipitées, ne rendent pas bien compte de la réalité biologique. Par exemple, les peptides pourront être incubés directement avec les cellules, le lysat des cellules sera analysé par western-blot en utilisant des anticorps anti-phospho-cofiline et anti-cofiline.

Dans le cadre du développement d'une molécule thérapeutique, il est nécessaire de déterminer rapidement et précisément la capacité d'un inhibiteur à interagir avec sa cible (*target engagement*). Ce tri initial (*screening*) est déterminant pour l'avancée des études cliniques et souvent une étape préalable à toute étude biologie (étude d'activité, toxicité, clairance...). Comme cela a été abordé dans le chapitre d'introduction qui lui est dédié, la thermophorèse à micro-échelle (MST) serait une méthode de choix pour mener à bien le screening de l'interaction de molécules thérapeutiques, comme les *stapled peptides*, avec leur cible.

Ces travaux sur les *stapled peptides* ont permis de constituer un ensemble solide de données préliminaires pour déposer un projet ANR, actuellement en phase 2 pour la deuxième année consécutive.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Lorsque j'ai commencé mon doctorat, l'étude moléculaire de la régulation des LIM kinases, LIMK1 et de LIMK2, constituait le cœur de mon sujet.

Les LIMKs sont régulées de multiples façons. Toutefois, il est décrit dans la littérature que leur activation se fait principalement par la phosphorylation de la thréonine 505, elle-même assurée par des kinases situées en amont de leurs voies de signalisation. À l'issue de ma thèse, j'ai mis à jour un nouveau mécanisme de régulation de l'activité de ces protéines sur leur substrat principal, la cofiline. J'ai montré que la phosphorylation sur la thréonine 505 était nécessaire mais pas suffisante pour assurer une activité kinase optimale des LIMKs sur la cofiline. La dimérisation et la transphosphorylation des LIMKs sont deux processus fondamentaux pour permettre, d'une part, la phosphorylation de la thréonine 505 et, d'autre part, leur activité sur la cofiline. La tyrosine 630, un acide aminé situé tout au bout de l'extrémité C-terminale et dont le rôle n'a pas encore été pleinement élucidé est crucial pour que ces processus aient lieu.

Ces travaux, qui s'inscrivent dans l'étude approfondie des systèmes de régulation des LIMKs découverts il y a près de trente ans, constituent, je l'espère, un pas de plus vers la compréhension pleine et entière de leur fonctionnement moléculaire.

L'étude moléculaire du fonctionnement des kinases est le socle sur lequel se construisent la recherche et le développement de molécules à visée thérapeutique. J'ai eu la chance extraordinaire de pouvoir prendre part aux deux aspects de l'étude de ces protéines, en menant de front l'étude moléculaire de leur régulation et en prenant part au développement de molécules thérapeutiques qui les ciblent. Ce second projet a été mené en collaboration avec l'équipe « Protéines de Synthèse et Chimie Bioorthogonale » du CBM dirigée par Vincent Aucagne. Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence des inhibiteurs d'un genre nouveau, des *stapled peptides*, qui inhibent les LIMKs en ciblant de façon très spécifique leur interaction avec la cofiline. Parmi les treize peptides testés, j'ai montré que huit d'entre eux avaient une activité sur LIMK2.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont un espoir pour le développement de thérapies ciblant les LIM kinases, des protéines qui, bien qu'aucun inhibiteur les ciblant n'ait abouti à une mise sur le marché, demeurent encore aujourd'hui des cibles thérapeutiques d'intérêt.

En conclusion, ce travail de recherche doctoral a permis d'apporter des contributions significatives à la compréhension du fonctionnement des LIM kinases et au développement de thérapies les ciblant. Elles constituent une base solide pour des recherches futures visant ces protéines.

Sur une note plus personnelle, je suis extrêmement fière du travail mené au cours de ces quatre dernières années, de ce voyage dans le monde passionnant et déroutant des LIM kinases. Un voyage un peu frustrant, aussi. Parce qu'à chaque question à laquelle j'ai répondu au cours de cette thèse, plein d'autres se sont posées – avec leur lot d'incompréhensions et, parfois, d'émerveillement.

Aussi, je terminerai par cette citation de Marie Curie :

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 : La Thermophorèse à Micro-Echelle (MicroScale Thermophoresis, MST), un nouvel outil d'analyse des interactions entre biomolécules

Au cours de ma thèse, j'ai contribué au développement d'une nouvelle méthode d'analyse de l'interaction entre les LIMKs et des inhibiteurs petites molécules par Thermophorèse à Micro-Echelle, en collaboration avec l'équipe de chimie analytique de l'ICOA (R. Nehmé et R. Nasreddine) via l'encadrement d'une stagiaire de Master 2. Ces études sont précieuses car dans l'équipe sont aussi développés des inhibiteurs « petites molécules » des LIMKs en collaboration avec les équipes de chimie médicinale de l'ICOA (S. Routier et K. Plé) et de chémoinformatique (P. Bonnet et S. Aci-Sèche) dans le but de concevoir de nouvelles thérapies ciblant les LIMKs. In fine, le but de cette étude en thermophorèse est de pouvoir cribler à quasi-haut débit des librairies de composés (petites molécules chimiques, peptides, protéines) pour mettre en évidence des molécules qui interagissent avec les LIMKs et qui pourraient potentiellement influencer leur activité, soit en inhibant leur activité kinase, soit en bloquant leur interaction avec leurs partenaires (stratégie de *Protein/Protein Interaction disruption*).

Ma contribution dans cette étude a été remise en cause par Reine Nehmé à la toute fin de la rédaction de ma thèse. Aussi, j'ai dû supprimer cette partie « MST » de mon manuscrit pour le soumettre dans les temps et ne pas compromettre ma soutenance. Le Comité à l'Intégrité scientifique et à la Déontologie de la Recherche (CIDR) de l'université d'Orléans a alors été saisi. Par arbitrage du CIDR en date du 21 juin 2024, il a finalement été décidé que ma contribution dans ces travaux était effective et que je serai associée aux publications qui en découlent. Je remercie chaleureusement les membres du comité pour avoir fait valoir ma participation à ces travaux. Mes rapporteurs ont souhaité que cette partie « MST » soit réintégrée dans mon manuscrit final en Annexe. Cette Annexe 1 correspond donc à cette partie « MST ». Il y sera présenté l'introduction/étude bibliographique, les résultats et la conclusion de ces travaux.

I. Introduction/Etude bibliographique : La Thermophorèse à Micro-Echelle (MicroScale Thermophoresis, MST), un nouvel outil d'analyse des interactions entre biomolécules

I.1. Principe de la thermophorèse, ou effet Soret

La thermophorèse (du grec *thermós* « chaud » et *phoresis* « port, portage », aussi appelée thermodiffusion, thermomigration, effet Soret, ou encore effet Ludwig-Soret) est un phénomène physique correspondant au mouvement de particules lorsqu'elles sont soumises à un gradient de température, typiquement du chaud vers le froid pour les particules lourdes (effet Soret positif) et du froid vers le chaud pour les particules légères (effet Soret négatif). Durant tout ce temps, la thermophorèse va entrer en compétition avec le phénomène de diffusion de la matière qui tend à homogénéiser la composition du milieu, entraînant une diffusion des régions les plus concentrées vers les moins concentrées. Le principe de thermophorèse est connu depuis longtemps, puisque les premières observations du phénomène sur des mélanges gazeux remontent au milieu du XIX^{ème} siècle. Le chercheur allemand Carl Ludwig a été le premier à décrire la thermophorèse sur des mélanges liquides [157]. Mais il aura fallu attendre vingt ans et les travaux de Charles Soret sur l'eau saline pour avoir une description exhaustive du phénomène auquel on donna son nom [158]. Cependant, aujourd'hui encore, les mécanismes thermodynamiques expliquant le principe de la thermodiffusion en milieu liquide sont sujets à débat.

La thermophorèse, qui a été largement étudiée pour ses applications en chimie et en physique des matériaux, a connu un regain de popularité à partir des années 2000 de par son utilisation pour l'analyse du comportement de particules complexes comme les biomolécules. En 2002, Braun et Libchaber décrivaient le comportement de l'ADN plasmidique en solution lorsqu'il était soumis à un gradient de température provoqué par l'application locale d'un laser : dans une chambre à température ambiante, l'ADN va fuir la zone chaude et s'accumuler au niveau de la zone froide en grande concentration. À l'inverse, dans une chambre froide, on observe le phénomène inverse et l'ADN va se réfugier au niveau des zones chaudes [159].

Piazza et ses collaborateurs furent, quant à eux, les premiers à appliquer le principe de thermophorèse à des protéines en solution. Ils mirent notamment en évidence que le

comportement de lysozymes soumis à un gradient de température différait de celui de particules plus simples. Si les protéines présentent un caractère « thermophobe » lors de l'établissement du gradient de température, elles deviennent « thermophiles » lorsque celle-ci diminue. Les auteurs soulignent alors le rôle des interactions faibles, et notamment les interactions hydrophobes, dans le comportement de biomolécules complexes lors de la thermophorèse [160].

Il est aujourd'hui communément admis que la thermophorèse est un effet thermodynamique local extrêmement sensible qui dépend de plusieurs paramètres tels que la taille de la molécule, sa charge ou encore sa sphère d'hydratation. Ces paramètres peuvent eux-mêmes varier en fonction de l'environnement microscopique de la molécule : il a, par exemple, été mis en évidence l'importance cruciale du choix du solvant dans les analyses en thermophorèse, mais également l'état libre ou lié de la molécule voire sa conformation. Ces découvertes ont été cruciales dans l'utilisation de la thermophorèse pour les études d'interaction entre biomolécules, qui a connu une explosion ces dernières années grâce à la mise au point de la thermophorèse à micro-échelle [161–164].

I.2. La thermophorèse à micro-échelle

I.2.1. Principe

La thermophorèse à micro-échelle (*MicroScale Thermophoresis*, ou MST) est une application du principe de thermophorèse à l'analyse quantitative d'interactions entre molécules. Elle permet de mesurer le mouvement de molécules fluorescentes soumises à un gradient de température de quelques degrés Kelvin (2 à 6) créé par l'application locale d'un laser infrarouge, et ce à l'échelle microscopique (**Figure 27**). Le mouvement thermophorétique dépend de plusieurs paramètres physiques au nombre desquels la taille de la molécule et sa sphère d'hydratation, et il est perturbé par les interactions moléculaires. Ainsi, une molécule libre aura un mouvement thermophorétique différent de celui d'une molécule liée à un ligand, ce qu'il est possible de quantifier du fait de la sensibilité de la technique. Depuis sa mise au point par NanoTemper [162], la MST a connu de nombreuses applications dans le domaine de la recherche en sciences de la vie, en facilitant l'analyse de l'interaction entre biomolécules mais également l'interaction entre biomolécules et molécules synthétisées chimiquement, ce qui a notamment ouvert la voie à son utilisation en screening pharmacologique [165].

La MST dispose de nombreux avantages en comparaison des autres méthodes d'analyse d'interactions biophysiques telles que la résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance*, ou SPR), le titrage calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry, ou ITC) ou encore la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, ou DLS). Elle montre également des avantages conséquents par rapport aux méthodes biochimiques classiques telles que l'ELISA, le FRET ou le Western-Blot [161,166].

La MST est une méthode d'analyse quantitative entièrement optique, qui requiert simplement que l'un des partenaires de l'interaction soit capable d'émettre de la fluorescence sous une lumière d'excitation émise dans l'alignement du laser IR. Pour cela, plusieurs possibilités existent. La molécule peut être couplée à un fluorophore de façon extrinsèque, comme dans le cas des protéines recombinantes où la protéine d'intérêt est fusionnée à une autre protéine auto-fluorescente, ou bien par couplage chimique d'un fluorophore à la protéine d'intérêt purifiée. Par ailleurs, une méthode *label-free* permet de tirer profit de la fluorescence intrinsèque des protéines riches en acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) pour l'analyse de l'interaction avec leurs partenaires, cette protéine étant purifiée [161,163,166]. Pour la suite de ce chapitre, la molécule couplée à un fluorophore sera dénommée molécule-cible.

De nombreux tampons sont compatibles avec l'étude en MST, ce qui rend avantageuse l'utilisation de cette méthode, permettant l'analyse de cibles de nature variée. Lorsque l'on suit la fluorescence extrinsèque de la molécule-cible (protéine de fusion ou couplage chimique d'un fluorophore), l'analyse peut s'effectuer directement à partir de sérum ou de lysat cellulaire, ce qui permet de s'affranchir des étapes parfois délicates de purification. À contrario, lorsque l'on suit la fluorescence intrinsèque de la molécule-cible (autofluorescence des acides aminés aromatiques), il est nécessaire qu'elle soit purifiée [161,163,167,168]. La MST requiert également une quantité très faible d'échantillon, puisque l'analyse se fait directement dans des capillaires d'une contenance de quelques microlitres [166], et ne requiert pas de concentrations élevées de la molécule-cibles car cette technique est très sensible. Enfin, parce qu'elle se fait directement en solution, l'analyse en MST ne nécessite pas l'immobilisation de la molécule-cible, ce qui permet de préserver sa conformation et d'assurer l'intégrité des interactions moléculaires. On peut

ainsi déterminer la constante de dissociation du couple étudié (K_D) de façon plus précise et pertinente, et dans des conditions plus physiologiques [161,168].

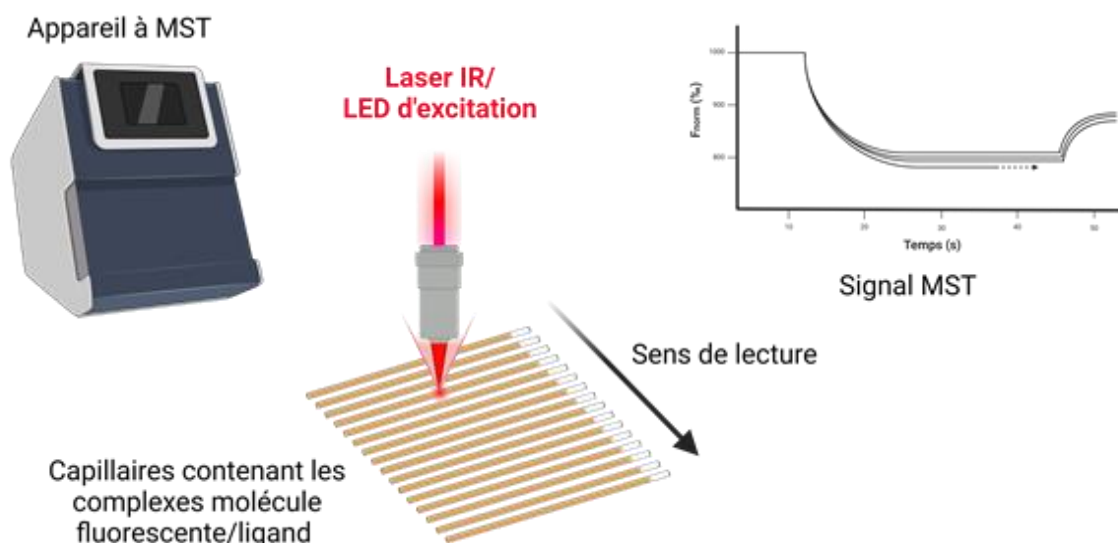


Figure 27 : Principe de la Thermophorèse à Micro-Echelle (MST).

Des capillaires contenant le complexe molécule fluorescente/ligand sont chauffés sous l'effet d'un laser infra-rouge (IR). Une LED vient exciter la molécule fluorescente pour permettre le tracé du signal MST.

I.2.2. Analyse du signal MST

Tout au long de l'analyse MST, la fluorescence de l'échantillon est mesurée en temps réel, normalisée et exprimée en pourcentage de fluorescence. Comme décrit par Jerabek-Willemsen et al. (2011) [162], le signal MST se découpe en plusieurs étapes distinctes, présentées **Figure 28**:

- Fluorescence initiale, ou *initial fluorescence*

Avant que le capillaire ne soit chauffé, la fluorescence initiale est mesurée. La molécule fluorescente est alors répartie de façon homogène dans la solution. Il est possible que la mise en contact de la molécule fluorescente et de son partenaire engendre des variations dans le signal de fluorescence du fait par exemple des modifications dans la sphère d'hydratation, dans la taille ou dans la conformation de la molécule-cible, et ce avant même l'allumage du laser. Dans la plupart des cas, toutefois, le signal de fluorescence est constant durant cette phase.

- Saut de température, *temperature jump*, ou *T-jump*

Le *T-jump* correspond à l'allumage du laser infrarouge et à l'augmentation rapide (moins d'une seconde) de la température dans le capillaire. C'est une phase très courte, de

quelques millisecondes, qui permet d'observer la sensibilité intrinsèque du fluorophore à la chaleur, avant même que le mouvement thermophorétique n'entre en jeu. On observe lors de cette phase un changement abrupt du signal de fluorescence, qui dépend exclusivement du fluorophore et de son environnement (tampons utilisés, acides aminés environnants), et qui est donc indépendant de la molécule-cible et/ou de son ligand.

- Thermophorèse, ou *thermophoresis*

La phase de thermophorèse, qui dure en moyenne une trentaine de secondes, correspond à l'échappement des molécules fluorescentes de la zone chaude après l'allumage du laser infrarouge. Durant cette phase, la fluorescence décroît progressivement jusqu'à atteindre un plateau où les forces de thermophorèse et de diffusion chimique s'équilibrent. Cette phase permet de discriminer les mesures où la molécule-cible est seule de celles où elle se trouve en interaction avec son partenaire. S'il existe une différence significative d'intensité de fluorescence entre les deux tracés, alors il existe une interaction entre les partenaires.

- Saut de température inversé, ou *inverse T-jump*

Lors de l'extinction du laser, le fluorophore va retourner à son état initial, lors du phénomène inverse du *T-jump* appelé *inverse T-jump*. Cette phase va également correspondre au refroidissement rapide de l'échantillon et à la disparition du gradient de température à l'intérieur du capillaire. Elle se déroule immédiatement avant l'étape de rétrodiffusion.

- Rétrodiffusion, ou *backdiffusion*

Lors de la thermophorèse, de par l'effet du gradient de chaleur, il y a hétérogénéité des concentrations à l'intérieur du capillaire. Dernière étape du signal MST, la rétrodiffusion est le retour de l'échantillon à son état d'équilibre par l'effet de la diffusion chimique, qui permet de nouveau une répartition homogène des molécules dans l'échantillon. Lors de cette phase, la fluorescence croît de nouveau. Le retour à un état d'équilibre dépend de la taille de la molécule-cible et la rétrodiffusion permet d'obtenir des informations sur l'intégrité de celle-ci après la thermophorèse. Par exemple, si un changement de fluorescence est observé après la rétrodiffusion, il est possible d'envisager que la molécule ait changé de caractéristique physique (oligomérisation, agrégation, dégradation, changement de taille) après la thermophorèse.

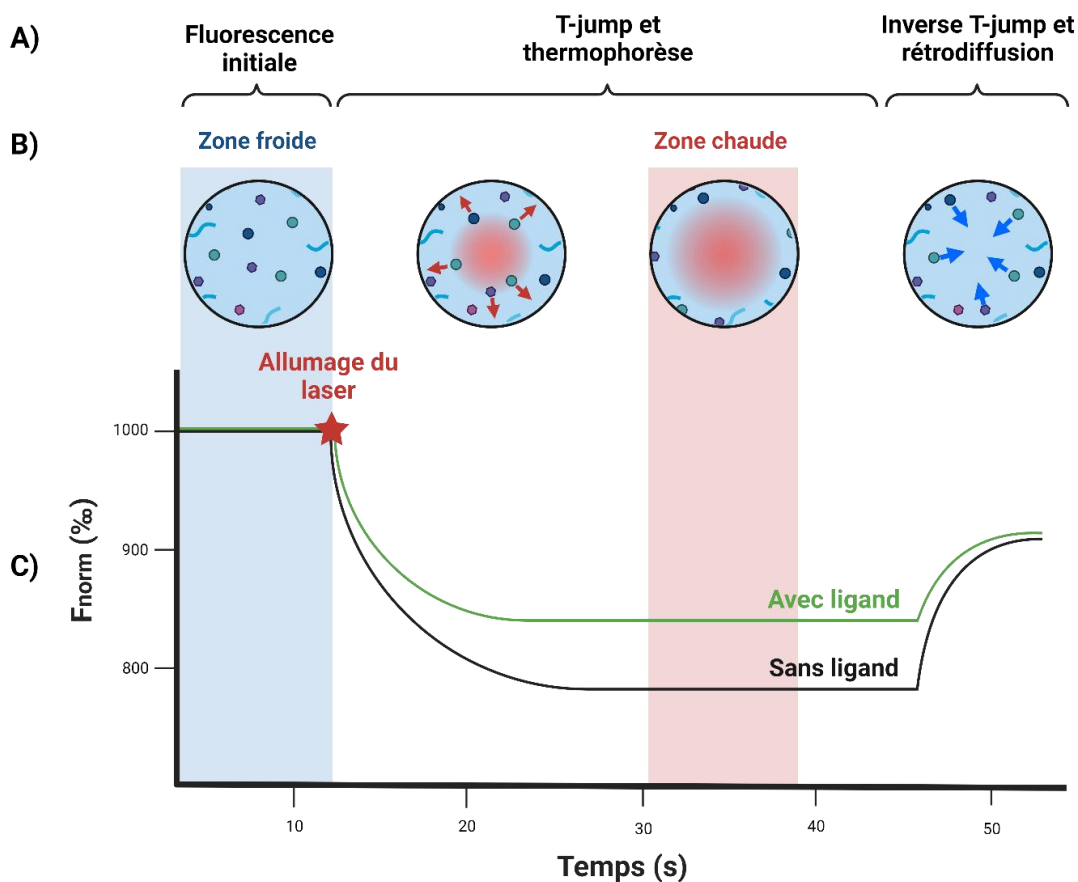


Figure 28 : Représentation du signal MST.

Sont représentées : en **A**) les différentes phases (fluorescence initiale, T-jump et électrophorèse, Inverse T-jump et rétrodiffusion), en **B**) les zones froides et chaudes correspondant au gradient de température dû à l'allumage et à l'extinction du laser et **C**) les courbes d'affinité de la cible seule et de la cible liée à son ligand.

I.3. Application à l'étude des interactions entre biomolécules

Les interactions entre biomolécules, qu'il s'agisse de protéines ou d'acides nucléiques, jouent un rôle central dans l'homéostasie de la cellule. De fait, l'analyse de leurs interactions est un enjeu essentiel pour la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la vie cellulaire, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. La mise au point de la MST a ouvert une nouvelle voie pour la recherche fondamentale en biologie moléculaire mais aussi pour la recherche clinique, en permettant de faciliter l'étude des interactions entre molécules du vivant et molécules pharmacologiques [165,168–171]. Quelques exemples de son application dans l'étude des interactions entre biomolécules sont développés ci-dessous.

I.3.1. Interaction protéine-protéine

Les interactions protéine-protéine (*Protein-protein interactions*, ou PPIs) sont un domaine essentiel de la recherche sur le vivant. Le développement de la MST a permis de faciliter l'étude de ces phénomènes dans des conditions plus physiologiques.

Arbel et al. (2012) ont, par exemple, réussi à mettre en évidence l'interaction entre les protéines purifiées Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra Large) et VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel 1) par MST. Bcl-xL est une protéine de la famille Bcl-2 aux propriétés anti-apoptotiques. Lorsque Bcl-xL est surexprimée dans le cancer, elle est alors corrélée à une plus grande malignité des tumeurs solides et une résistance à la chimiothérapie. VDAC1, quant à elle, est impliquée dans le contrôle de l'apoptose via le relargage du cytochrome c et l'activation de la voie des caspases. Arbel et al. (2012) ont démontré que l'interaction entre Bcl-xL et VDAC1 promouvait la survie des cellules en empêchant la libération du cytochrome c. La mise en évidence de cette interaction a permis d'offrir une nouvelle stratégie thérapeutique par l'inhibition de l'interaction entre Bcl-xL et VDAC1 via l'utilisation de peptides interférents basés sur la séquence de la partie de VDAC1 en interaction avec Bcl-xL [172].

Programmed cell Death protein 1 (PD-1) est une protéine exprimée à la surface des lymphocytes T et B. C'est un acteur majeur de la tolérance du système immunitaire aux cellules du « soi », prévenant ainsi la survenue de maladies auto-immunes. Les ligands de PD-1, appelés Programmed death-ligand 1 (PD-L1) sont, en temps normal, seulement exprimés à la surface des macrophages. Toutefois, on les retrouve également à la surface de certaines cellules cancéreuses, empêchant ainsi le système immunitaire de les reconnaître et de les combattre [173]. Le développement d'immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 et, de fait, l'étude de l'interaction entre PD-1 et PD-L1, est au cœur de plusieurs stratégies anti-cancéreuses. Cette dernière a été étudiée à plusieurs reprises par résonance plasmonique de surface (SPR) et par Titration calorimétrique Isotherme (ITC), ce qui a conduit à des données contradictoires quant à la valeur du K_D de l'interaction. Magnez et al. (2017) ont réussi à déterminer par MST une constante de dissociation de 8.5 μM pour le couple PD-1 et PD-L1, ce qui était en accord à des données de SPR obtenues précédemment par Cheng et al. (2013) [168,174,175].

Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) est une protéine adaptatrice impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Elle joue un rôle dans le processus

de tumorigenèse, et plus particulièrement dans le développement de métastases lorsqu'elle est surexprimée, participant ainsi à la cancérogenèse à travers plusieurs processus dont la perte d'adhésion, l'angiogenèse ou encore le remodelage de la matrice extracellulaire [176]. Lin et al. (2012) ont étudié par MST la dimérisation de Grb2 et son implication dans la régulation de l'activité du récepteur de type 2 au FGF (Fibroblast Growth Factor) (FGFR2), un récepteur à activité tyrosine kinase. Sous forme de dimère, Grb2 se lie à deux molécules de FGFR2, ce qui va empêcher la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de FGFR2 et son activation. Sous l'effet d'une stimulation par un facteur de croissance, FGFR2 va phosphoryler le dimère Grb2 et favoriser sa dissociation, permettant la phosphorylation de sa propre extrémité C-terminale et son activation. La dimérisation de Grb2 est un phénomène déterminé par l'équilibre entre dimères et monomères de Grb2. De fait, c'est un processus transitoire, peu facile à mesurer, qui peut être mobilisé très rapidement en fonction des besoins de la cellule. L'utilisation de la MST a permis l'établissement d'une constante de dissociation pour le dimère Grb2 d'environ $0.7\mu\text{M}$ [177].

Bien d'autres exemples sont décrits dans la littérature, car les applications de la MST à l'étude des interactions protéine-protéine sont nombreuses et variées. La MST est une technique puissante, qui permet d'obtenir des données quantitatives rapidement, de façon simple et en utilisant très peu d'échantillons, ce qui en fait un outil particulièrement intéressant. Sa sensibilité permet d'étudier des systèmes biologiques parfois complexes, régis par des interactions souvent transitoires ou faibles.

I.3.2. Interaction protéine-ligand

L'affinité entre les protéines-cibles et les petites molécules chimiques est au cœur de la recherche clinique, au même titre que le design rationnel et la synthèse chimique. La MST a permis un criblage facilité de molécules chimiques, d'autant plus intéressant qu'il permet d'étudier l'interaction entre le ligand et la protéine directement dans son environnement cellulaire, une matrice complexe qui peut avoir une influence sur l'interaction entre la protéine et son ligand.

Les PROTACs (PROteolysis-TArgeting Chimeras) sont des molécules thérapeutiques innovantes dont le mécanisme d'action repose sur la dégradation de leur cible par le système ubiquitine-protéasome plutôt que par l'inhibition de leur activité. Ce sont des molécules bifonctionnelles qui interagissent d'une part avec la cible à dégrader et,

d'autre part, avec des ubiquitine ligases. Ils conduisent à un rapprochement physique entre la cible et l'ubiquitine ligase, qui va ubiquitinyler cette dernière et conduire à sa dégradation par le protéasome. Caractériser l'affinité des PROTACs pour leurs deux partenaires est donc une étape indispensable pour leur conception rationnelle (*rational design*). Bartoschik et al. (2021) ont caractérisé par MST les complexes binaires et ternaires formés par le PROTAC « MZ1 » avec ses cibles, des protéines BET (Bromodomain and Extra-Terminal motif), et l'ubiquitine ligase associée. Ils ont ainsi pu classer les différentes protéines BET en fonction de la coopérativité du PROTAC « MZ1 » dans le complexe ternaire et mettre en évidence que certains complexes étaient plus stables que d'autres [178].

La Fragment-Based Lead Discovery (FBLD) est une technique d'identification rapide de composés intéressants de par leur activité biologique. Elle est basée sur le criblage de fragments chimiques qui vont avoir peu d'affinité pour la cible biologique mais vont servir de charpente à l'élaboration de molécules plus affines et plus actives d'un point de vue biologique. Linke et al. (2016) ont appliqué la MST au criblage de 193 fragments chimiques dans le but de cibler la protéine MEK1 (Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase 1), laquelle est impliquée dans le développement de tumeurs. Ils sont parvenus à identifier plusieurs fragments affins pour MEK1, ce qui a été confirmé par cristallographie aux rayons X. Par ailleurs, la MST a offert des informations supplémentaires sur l'intégrité de la protéine après interaction avec les fragments chimiques, ce qui a permis d'emblée d'écarter les fragments qui induisaient une déstabilisation/agrégation de la protéine-cible [179].

Les voies de signalisation des GTPases Rho sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le remodelage du cytosquelette, le cycle cellulaire ou encore l'expression de certains gènes. Leur activité est régulée par les Rho Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs) qui les activent en échangeant le GDP lié à la GTPase Rho avec un GTP [180]. Il a été montré que certains GEFs étaient surexprimés dans des lignées cancéreuses. L'inhibition de l'interaction entre les GEFs et GTPases Rho représente donc une opportunité thérapeutique. Shang et al. (2013) ont réussi à mettre en évidence plusieurs molécules chimiques de classe Y16 qui seraient susceptibles d'inhiber l'interaction entre LARG, une GEF, et RhoA, par criblage virtuel (*virtual screening*). Par MST, ils sont parvenus à déterminer un K_D d'interaction de 76 nM entre une molécule chimique de classe

Y16 et LARG, ce qui a permis d'appuyer par des données expérimentales les résultats obtenus *in silico* sur l'interaction entre ces deux molécules, conduisant à l'inhibition de l'activité GTPase de RhoA [181].

I.3.3. Interaction des acides nucléiques

Les interactions entre acides nucléiques, entre acides nucléiques et protéines ou entre acides nucléiques et ligands ont été largement étudiées ces dernières années, du fait de leur importance dans la régulation de l'homéostasie cellulaire (réplication de l'ADN, transcription, épigénétique, traduction, extinction de gène...) [182].

Les études d'interaction avec l'ARN ont regagné en popularité avec l'avancée des recherches sur les ARN non codants, dont l'importance et la diversité des fonctions avaient été jusque-là largement sous-estimées et qui représentent pourtant l'essentiel de l'expression génomique. Il apparaît aujourd'hui crucial de mieux comprendre l'interaction entre les ARN et les autres catégories de biomolécules, que ce soit pour affiner nos connaissances sur la régulation de certains mécanismes cellulaires ou pour mettre au point de nouvelles thérapies ciblant l'ARN. Moon et al. (2018) ont notamment utilisé la MST pour mettre en évidence des interactions entre ARN et diverses catégories de ligands (riboswitchs, petites molécules chimiques, peptides) avec des affinités variables pour l'ARN. Pour toutes les catégories de ligands, la MST a donné des résultats comparables aux techniques classiquement utilisées, avec l'avantage d'être plus économique dans la consommation des échantillons [183].

Les interactions entre la chromatine et les protéines de liaison à l'ADN (histones, facteurs de transcription, polymérases...) constituent le premier niveau de régulation de l'expression génomique. En dépit des avancées dans le domaine, il est encore aujourd'hui nécessaire de mieux comprendre la régulation fine de ces mécanismes et cela passe notamment par l'étude des interactions entre ADN et protéines. Corbeski et al. (2018) ont étudié par MST les interactions avec la chromatine au sein de plusieurs systèmes protéiques. Ils ont par exemple mis en évidence que l'interaction entre l'histone HMfB de l'archée *Methanothermus fervidus* et la chromatine était différente en fonction de la quantité d'histone présente dans le milieu : à grande concentration, les interactions entre HMfB et la chromatine sont aspécifiques et la compaction de l'ADN est alors indépendante de la séquence de reconnaissance de cette histone. À plus faible concentration, l'ADN est

plus compact uniquement au niveau des zones spécifiques d'interaction entre la chromatine et HMfB [184].

La quantification des ARN non codants est également un enjeu crucial pour la compréhension de certains mécanismes cellulaires qui dépendent de l'abondance en certains ARN à un instant T de la vie de la cellule. Par exemple, les ARN non codants jouent un rôle crucial dans la régulation de l'embryogenèse, un phénomène extrêmement régulé tant au niveau spatial que temporel [185]. Jacob et al. (2019) ont utilisé la MST pour quantifier de façon absolue des ARN non codants avec l'aide d'un ADN complémentaire (ADNc) marqué d'un fluorophore. L'interaction entre l'ADNc marqué, de haute affinité pour l'ARN qu'il reconnaît spécifiquement, et ce dernier permet de déterminer précisément la quantité en ARN à un instant donné. De cette manière, ils sont, par exemple, parvenus à quantifier de façon précise et reproductible des ARN de transfert (tRNA) de *Saccharomyces cerevisiae* via les ADNc associés, en présence ou non de la toxine tueuse de *Pichia acaciae* (PaT), une protéine qui dégrade les tRNA [186].

En conclusion, la thermophorèse à micro-échelle est une technique prometteuse pour l'analyse d'interactions entre biomolécules. Elle permet d'étudier les interactions moléculaires (protéine-protéine, protéine-acides nucléiques, acides nucléiques-acides nucléiques), la liaison de ligands (PROTACs, peptides, molécules chimiques), la cinétique de certaines réactions et bien d'autres processus biologiques. C'est une méthode robuste, qui permet d'obtenir des données quantitatives sur les interactions moléculaires de façon précise, rapide et reproductible. Elle est très peu consommatrice en échantillons et permet de travailler directement dans des systèmes complexes comme le sérum ou le lysat cellulaire. Tout cela constitue un avantage conséquent au regard des autres techniques d'analyse biophysique classiquement utilisées.

La thermophorèse à micro-échelle représente également une avancée significative dans le domaine de la recherche fondamentale et appliquée en biologie.

II. Résultats

II.1. Etude des interactions entre les LIMKs et petites molécules inhibitrices par MST

Comme cela a été mentionné dans l'étude bibliographique présentée au **chapitre I** de cette annexe, la MST est une technique entièrement optique qui nécessite que l'un des partenaires du couple étudié soit fluorescent. Or, pour les études en MST avec l'appareil Monolith® NT.115^{pico} (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany) dont dispose l'ICOA, il faut un fluorophore émettant dans le rouge (excitation à 625nm, émission à 685nm). Par ailleurs, les LIMKs sont des protéines difficiles à purifier. Pour les études structurales, certains de leurs domaines ont été surproduits en cellules d'insectes mais les rendements obtenus sont faibles. Il n'est pas envisageable de purifier ces protéines et de les marquer ensuite par un fluorophore de type Red-NHS comme préconisé par Nanotemper. Nous avons donc décidé de développer une protéine de fusion où notre protéine d'intérêt (LIMKs entières ou domaines kinases) est étiquetée avec un fluorophore émettant dans le rouge, et de travailler directement sur les lysats cellulaires. Après quelques recherches bibliographiques, Béatrice Vallée a choisi le fluorophore RFP670, dont les propriétés spectrales (longueurs d'onde d'excitation et d'émission) correspondent parfaitement aux exigences de l'appareil de l'ICOA. Ce fluorophore, assez nouveau, émet dans le proche infra-rouge (*Near infra-red*, *NIR*) [187]. Les fluorophores NIR sont caractérisés par une faible autofluorescence et une phototoxicité minimale, ce qui a rendu leur utilisation en imagerie *in vivo* du petit animal particulièrement intéressante [188]. Par ailleurs, ce fluorophore a été optimisé et plusieurs versions sont disponibles (monoRFP670, nanoRFP670, enhanced RFP670) ce qui ouvre de vastes champs d'investigation. Enfin, le fluorophore miRFP670 n'a encore jamais été utilisé en MST.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, une autre étudiante, Solweig Chartier, a commencé la sienne au sein de l'équipe « Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs » dirigée par Reine Nehmé à l'ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique) à Orléans. Un de ses objectifs était le développement de cette méthode d'analyse de l'interaction entre les LIMKs et de petites molécules chimiques par MST. La thèse de Solweig Chartier est réalisée en co-tutelle entre l'ICOA et le COBRA (Chimie organique, Bioorganique, Réactivité et Analyse) à Rouen, dans le cadre d'un financement LabEx. Lorsque Solweig est partie à Rouen, elle avait construit les protéines de fusion miRFP670-LIMK2 et

miRFP670-KIN-LIMK2, et obtenu des résultats préliminaires en MST. Une stagiaire de Master 2, Mélanie Rapeto, a alors été recrutée sur un financement de la Fédération de Recherche CBM/ICOA pour permettre un continuum sur les expériences de MST. Béatrice Vallée m'a proposé d'encadrer cette stagiaire côté CBM, l'encadrement côté ICOA étant assuré par Rouba Nasreddine, Maître de Conférences dans l'équipe de Reine Nehmé et spécialiste de la MST sur les biomolécules. Bien que le sujet n'ait pas été directement en lien avec ma thèse, j'ai accepté avec enthousiasme cette opportunité, qui m'offrait tout à la fois une expérience d'encadrement et une ouverture extrêmement intéressante sur mon sujet de thèse, en me permettant d'aborder les LIM kinases, les protéines au cœur de mon sujet de thèse, sous un angle entièrement différent.

J'ai donc encadré Mélanie Rapeto de février à juillet 2022. Sous ma supervision, elle a réalisé les clonages de LIMK1 et du domaine kinase de LIMK1, tous deux fusionnés au fluorophore miRFP670, les a transfectés en cellules HEK293 pour les surproduire. Mélanie a ensuite développé les expériences de MST à l'ICOA sous la supervision de Rouba Nasreddine. En premier lieu, elle a réalisé toute la mise au point en testant notamment les conditions de conservation des lysats afin d'éviter de refaire des transfections chaque semaine (détermination du pourcentage de glycérol optimal), l'influence du DMSO (solvant des inhibiteurs), les conditions de centrifugation pour minimiser la formation d'agrégats. Par la suite, elle a optimisé les signaux obtenus pour les quatre constructions et réalisé les expériences d'interaction avec deux inhibiteurs commerciaux des LIMKs décrits dans la littérature, LX7101 et BMS5 (LIMKi3). Elle a ainsi pu déterminer les K_D d'interaction et les comparer à ceux de la littérature.

Les résultats issus de cette étude, obtenus sur la base des travaux développés dans le cadre de ce stage de Master 2 et, par la suite, des travaux de Solweig Chartier, font l'objet d'un premier article mettant en lumière le potentiel de la MST comme outil d'analyse des interactions moléculaires détectées directement sur un lysat cellulaire avec une protéine de fusion couplée au fluorophore miRFP670. Ils font la preuve de concept de son utilisation possible pour le criblage de molécules thérapeutiques. Par décision du CIDR, je serai associée à cet article.

Après le départ de Mélanie, j'ai continué à fournir Solweig Chartier en lysats où les LIMKs fusionnées miRFP670 sont surproduites en cellules HEK 293 et ce afin qu'elle réalise des expériences de thermodynamique en MST et d'électrophorèse capillaire. Deux

autres articles auxquels je serai également associée par décision du CIDR sont issus de ces travaux.

Une autre série d'expérience en MST a été réalisée, mais cette fois pour évaluer la possibilité de travailler directement sur des cellules HEK293 entières, intactes et vivantes, en MST. Ces cellules sont alors directement incubées avec les inhibiteurs (LX7101 et BMS5/LIMKi à 5 et 25 μ M), ou du DMSO. À nouveau, j'ai produit le matériel biologique pour Solweig Chartier en assurant l'entretien des lignées cellulaires, la transfection des cellules par les plasmides LIMKs fusionnées miRFP670 et en déposant les inhibiteurs sur des cellules HEK293. Après deux heures d'incubation à 37°C, les cellules étaient récupérées par Solweig pour qu'elle les analyse en MST. Des résultats tout à fait prometteurs ont été obtenus. Un article devrait prochainement être rédigé. Là encore, j'y suis associée par décision du CIDR.

II.2. Analyse de l'interaction entre LIMK2 et la cofiline par MST

II.2.1. Introduction

Forte de cette expérience acquise en MST et convaincue du potentiel de la technique, j'ai testé l'interaction de LIMK2 avec la cofiline purifiée en MST. L'idée était ensuite de tester l'interaction de mes mutants (LIMK2a-Y630A et LIMK2a-Y630F) avec la cofiline en MST. En co-immunoprécipitation, nous n'avons pas détecté de différence d'interaction entre les différents mutants et la cofiline. Nous en avons conclu que l'impact de la mutation sur l'activité kinase de LIMK2a-Y630A n'était pas dû à un manque d'interaction avec la cofiline. Cependant, la MST étant une méthode très sensible, nous avons pensé qu'elle pourrait permettre de mettre à jour de potentielles différences entre la protéine sauvage et le mutant LIMK2a-Y630A, grâce à la détermination des K_D respectifs.

II.2.2. Matériel et méthodes

Production des protéines recombinantes et purification de la cofiline

Le matériel et les méthodes employés pour produire les lysats où sont surproduites les LIMKs dans cette section sont identiques à ceux détaillés dans l'article 1. Le matériel et méthodes utilisés pour produire et purifier la cofiline sont également détaillés dans l'article 1. Le plasmide miRFP670-LIMK2a dans cette étude est celui construit par Solweig.

***Binding check* de l'interaction de LIMK2 avec la cofiline par MST**

Au lysat des HEK293 contenant miRFP670-LIMK2 a été ajouté 30 % (v/v) de glycérol (afin de pouvoir les stocker à -20°C et les réutiliser sans transfecter à chaque fois, le pourcentage ayant été déterminé par les expériences de Mélanie). Cette solution est ensuite diluée au 1/5^{ème} dans du tampon de lyse (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA, 50 mM de NaF, 10 mM de sodium pyrophosphate, 1 mM de Na₃VO₄, 20 mM de p-nitrophenyl phosphate, 20 mM de β-glycerophosphate, 10 µg/mL d'aprotinine, 0,05 µg/mL d'acide okadaïque, 1 µg/mL de leupeptin, and 1 mM de PMSF). Pour réaliser le *binding check*, il est nécessaire de préparer huit capillaires. Quatre capillaires contiennent la protéine fluorescente seule (ici, miRFP670-LIMK2) et quatre autres contiennent la protéine fluorescence incubée avec son ligand en quantités équimolaires (ici, miRFP670-LIMK2/cofiline). Pour préparer les quatre premiers capillaires, miRFP670-LIMK2 seule, une dilution au 1/2 a été réalisée mais cette fois dans le tampon de purification de la cofiline (TBS Tris-Buffered Saline, Tris 20mM, NaCl 150mM, pH 8) pour permettre une homogénéité dans la composition du milieu entre les deux séries de capillaires. La dilution finale du lysat miRFP670-LIMK2 est au 1/10^{ème} tandis que celle de la cofiline est au 1/2. On prépare 20µL par capillaire. S'agissant de protéines humaines, la mesure a été réalisée à 37°C.

***Binding affinity* de l'interaction de LIMK2 avec la cofiline par MST**

Le lysat cellulaire a été préparé comme précédemment avec une dilution finale au 1/5^{ème}. Pour réaliser le *binding affinity*, il est nécessaire de préparer seize capillaires : chaque capillaire contient une quantité fixe de LIMK2 avec une dilution finale au 1/10^{ème} et une quantité décroissante de cofiline, du capillaire 1 au capillaire 16. La cofiline a été préparée par dilutions en série au 1/2 dans son tampon de purification pour un volume final de 10µL. 10µL de LIMK2 ont ensuite été ajoutées à chaque dilution de cofiline pour un volume final de 20µL de solution préparée par capillaire. La mesure a été réalisée à 37°C.

II.2.3. Résultats

D'un point de vue purement technique, l'acquisition du signal MST se déroule idéalement en trois temps. Dans un premier temps, on réalise un ***pre-test***. Ce *pre-test* permet d'évaluer le comportement de la molécule fluorescente, et notamment :

- **L'intensité de fluorescence** : idéalement, il faut se situer entre 3000 et 6000 coups. Au-delà de 15000 coups, il faut envisager de diluer l'échantillon. À 25000 coups, l'appareil sature. En dessous de 300, l'échantillon n'est pas utilisable parce qu'on se situe dans le bruit de fond. Elle ne doit pas varier de plus de 10% entre chaque capillaire.
- **Adsorption** : le verre des capillaires est traité pour permettre une répartition homogène de l'échantillon. Néanmoins, il arrive que la molécule parvienne à s'adsorber sur les parois du capillaire. Cela va induire un biais dans le mouvement thermophorétique et dans le signal de fluorescence, puisqu'une partie des molécules va rester « collée » contre la paroi. L'adsorption est caractérisée par un signal de fluorescence double et/ou des courbes peu superposables. Il est possible d'y remédier en augmentant la quantité de détergent dans le milieu ou en utilisant des capillaires coatés, plus coûteux.
- **Agrégation** : la formation d'agrégats est l'un des principaux problèmes rencontrés en MST. L'agrégation diminue l'homogénéité de l'échantillon et se caractérise par des tracés irréguliers. Pour y remédier, il est possible de minimiser l'agrégation par centrifugation préalable de l'échantillon ou, de nouveau, en ajoutant du détergent dans le milieu.
- **Photoblanchiment** : le photoblanchiment correspond à l'altération du fluorophore. À chaque mesure, pendant le *pre-test* mais également lors du *binding check* et du *binding affinity*, les capillaires sont lus deux fois pour assurer qu'il n'y ait pas eu de changement dans l'intensité de fluorescence après le passage du laser infra-rouge.

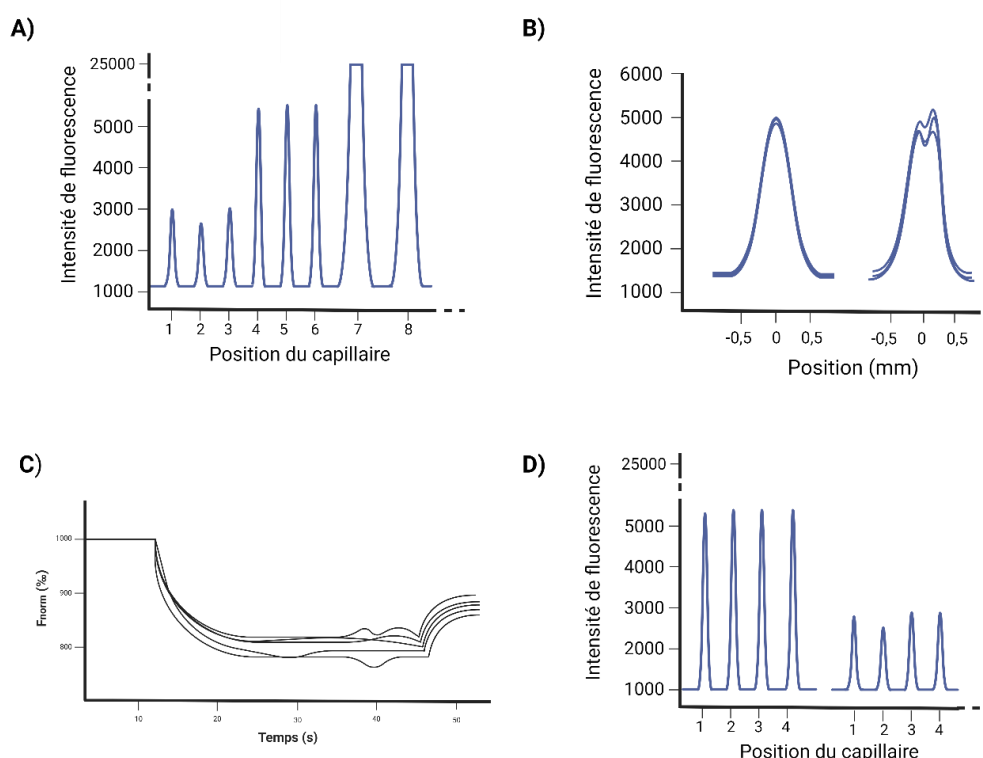


Figure 29 : La MST nécessite une optimisation des conditions expérimentales.

A) Scan de capillaires contenant des concentrations différentes en molécules fluorescente. Le signal de fluorescence doit être régulier et doit idéalement se situer entre 3000 et 6000 coups (capillaire 4 à 6). En-dessous de 3000 coups (capillaire 1 à 3), le signal peut ne pas être interprétable : on se rapproche du bruit de fond. Au-delà de 25000 coups, le signal sature (capillaires 7 et 8), il faut alors diluer l'échantillon. **B)** L'adsorption peut avoir un effet sur la qualité du signal de fluorescence. À gauche, superposition des tracés pour trois capillaires sans adsorption détectable. À droite, superposition des tracés pour trois capillaires avec fort effet d'adsorption, présentant le double signal caractéristique et une faible superposition des courbes. **C)** Signal MST d'une solution peu homogène contenant des agrégats. Les tracés apparaissent irréguliers. **D)** Différence d'intensité de fluorescence entre deux lectures, capillaires 1 à 4 avant et après passage du laser infra-rouge, témoignant d'un photoblanchiment du fluorophore.

Bien qu'il ne soit pas nécessaire, le *pre-test* est fortement encouragé dans le cas où la molécule fluorescente est utilisée pour la première fois puisqu'il permet notamment d'optimiser les conditions d'expérimentation (**Figure 29**). L'étude de l'interaction entre LIMK et la cofiline fait suite à l'étude menée sur l'interaction entre LIMK et petites molécules inhibitrices, nous avons donc déjà un bon recul sur la protéine miRFP670-LIMK2 et sommes directement passés au *binding check*.

Le **binding check** permet de comparer le ratio signal sur bruit pour la cible seule (ici, LIMK2) avec le ratio signal sur bruit pour le complexe cible/ligand (ici, LIMK2/cofiline) lorsque le ligand est introduit à sa concentration maximale. Cette étape permet de déterminer rapidement s'il existe une interaction entre la cible et son ligand. J'ai réalisé deux binding check lors de l'étude de l'interaction LIMK2/cofiline : un

immédiatement après la préparation des échantillons et un second après 30mn. Dans le second cas, les échantillons sont restés dans l'appareil, à 37°C.

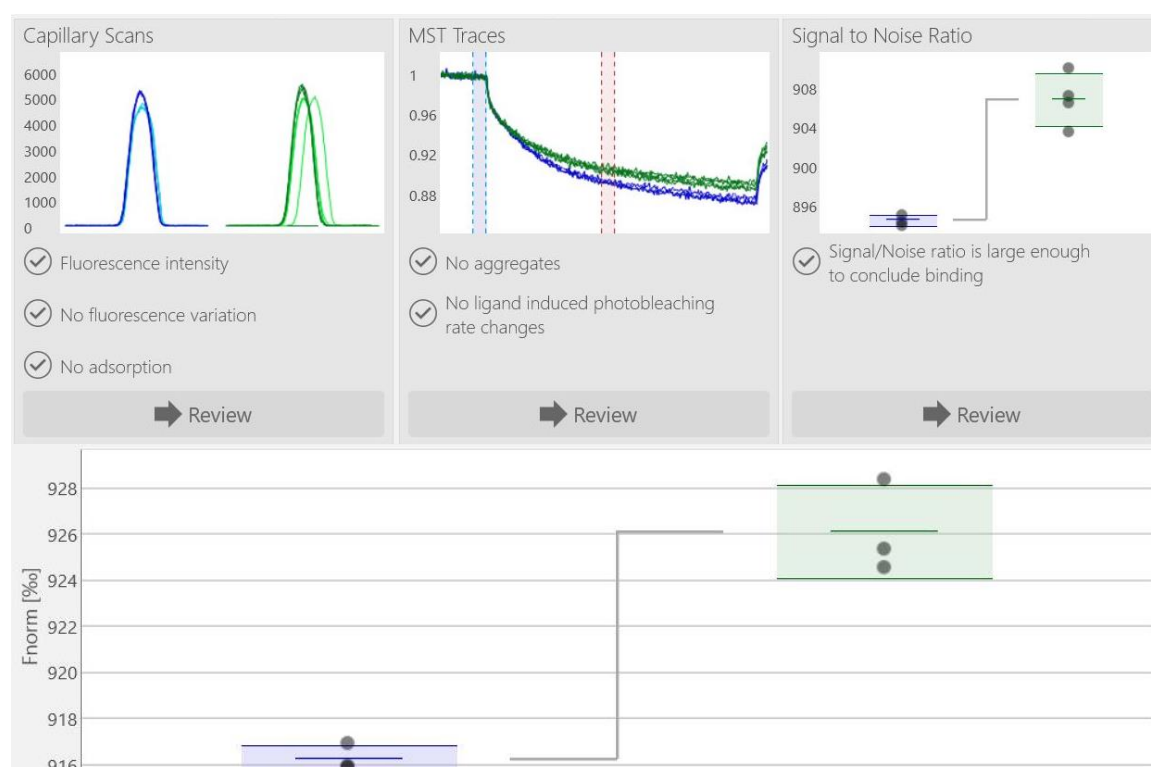


Figure 30 : La cofiline et LIMK2 interagissent en MST.

Le lysat des HEK293 contenant miRFP670-LIMK2 a été préparé en ajoutant 30 % (v/v) de glycérol. Il a ensuite été dilué au 1/5^{ème} dans du tampon de lyse. Pour réaliser le binding check, il est nécessaire de préparer huit capillaires. Quatre capillaires contiennent LIMK2 seule. Le lysat est de nouveau dilué au 1/2 mais cette fois dans le tampon utilisé pour la purification de la cofiline pour une dilution finale au 1/10^{ème} de LIMK2. Quatre capillaires contiennent le complexe LIMK2/cofiline en quantités équimolaires. On prépare 20µL par capillaire. La mesure a été réalisée à 37°C.

Sur le premier *binding check* que j'ai réalisé, présenté **Figure 30**, j'ai pu voir que l'intensité de fluorescence, entre 5000 et 6000 coups, était correcte pour nos conditions (LIMK2 diluée au 1/10^{ème}). Toutefois, les tracés de fluorescence étaient peu superposables, surtout pour les capillaires contenant les complexes LIMK2/cofiline. Cela peut être imputé au fait que la solution n'est pas homogène dans le capillaire ou une légère adsorption des molécules. De façon empirique, Rouba Nasreddine a montré que laisser les capillaires dans l'appareil (chauffé à 37°C) permettait, dans le cas de protéines, une meilleure stabilisation des complexes et une diminution de l'adsorption. C'est donc ce que j'ai fait par la suite en incubant pendant 30 minutes les capillaires à 37°C avant d'effectuer des mesures (**Figure 31**).

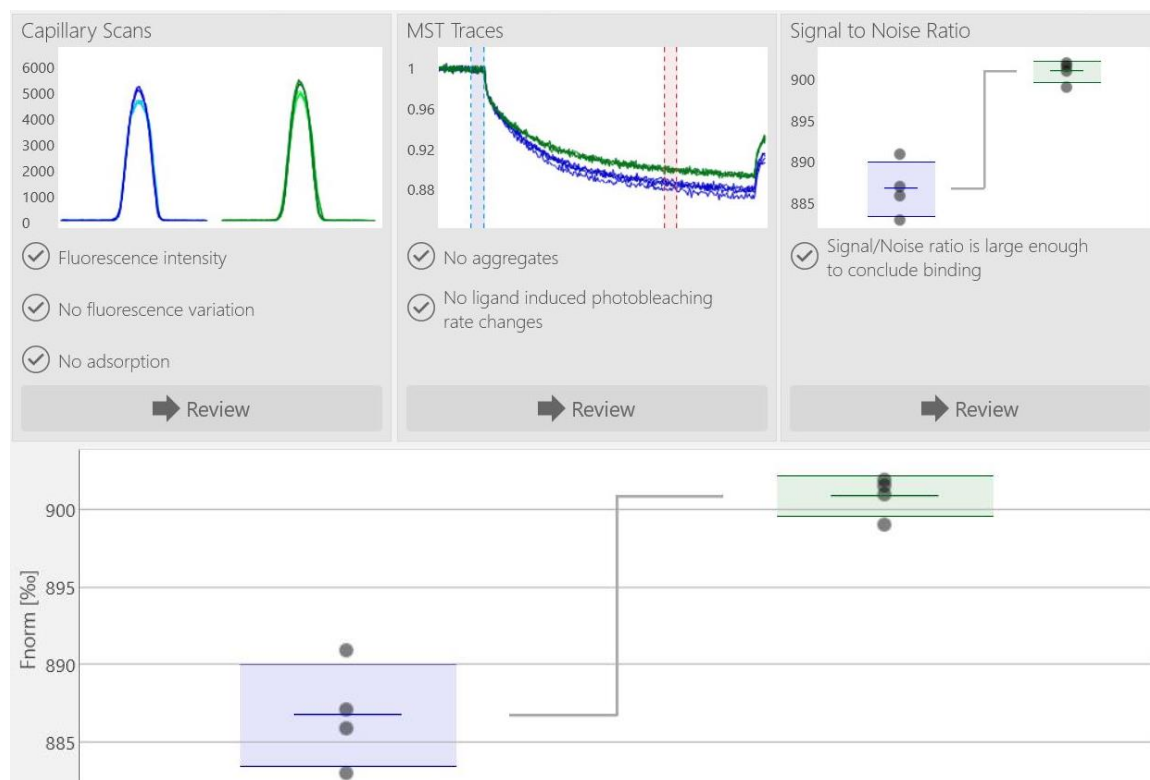


Figure 31 : Une incubation de 30mn suffit pour stabiliser les complexes.

Le lysat des HEK293 contenant miRFP670-LIMK2 a été préparé avec 30 % (v/v) de glycérol. Il a ensuite été dilué au 1/5^{ème} dans du tampon de lyse. Pour réaliser le binding check, il est nécessaire de préparer huit capillaires. Quatre capillaires contiennent LIMK2 seule. Le lysat a été de nouveau dilué au 1/2 mais cette fois dans le tampon utilisé pour la purification de la cofiline pour une dilution finale au 1/10^{ème}. Quatre capillaires contiennent le complexe LIMK2/cofiline en quantités équivalentes. On prépare 20µL par capillaire. La mesure a été réalisée à 37°C, après 30mn d'incubation.

Sur le second *binding check*, présenté **Figure 31**, réalisé après 30 minutes d'incubation des capillaires à 37°C, j'ai pu voir que l'intensité de fluorescence, entre 5000 et 6000 coups, était toujours correcte. Cette fois, les tracés de fluorescence sont bien superposables, pour les capillaires contenant LIMK2 seule comme pour les capillaires contenant le complexe LIMK2/cofiline. De nouveau, les signaux MST sont nets, avec une différence significative entre les capillaires sans (en bleu) et avec la cofiline (en vert). Cela a permis de confirmer qu'il y a bel et bien une interaction entre LIMK2 et la cofiline.

Une fois le *binding check* validé, j'ai pu réaliser le *binding affinity*. Le *binding affinity* permet de tracer une courbe dose-réponse de l'intensité de fluorescence du complexe en fonction de la concentration du ligand. C'est cette mesure qui permet de déterminer le K_D du couple étudié. Le *binding affinity* de l'interaction entre LIMK2 et la cofiline a été réalisé trois fois en tout. Le premier *binding affinity* n'a pas donné de résultats concluants. Les deux autres *binding affinity* ont permis d'estimer un K_D d'interaction d'environ 5µM. Un de ces *binding affinity* est présenté **Figure 32**. Malheureusement, la

concentration en cofiline n'était pas assez élevée pour permettre un tracé optimal de la courbe dose-réponse, ce qui peut induire un biais dans le calcul du K_D . Par ailleurs, l'expérimentation aurait nécessité une quatrième mesure, donc troisième réplicat, en concordance avec les deux précédents pour être vraiment fiable. Cela dit, les résultats obtenus sont prometteurs et d'autant plus que la constante de dissociation du couple LIMK2/cofiline n'est pas connue à l'heure actuelle.

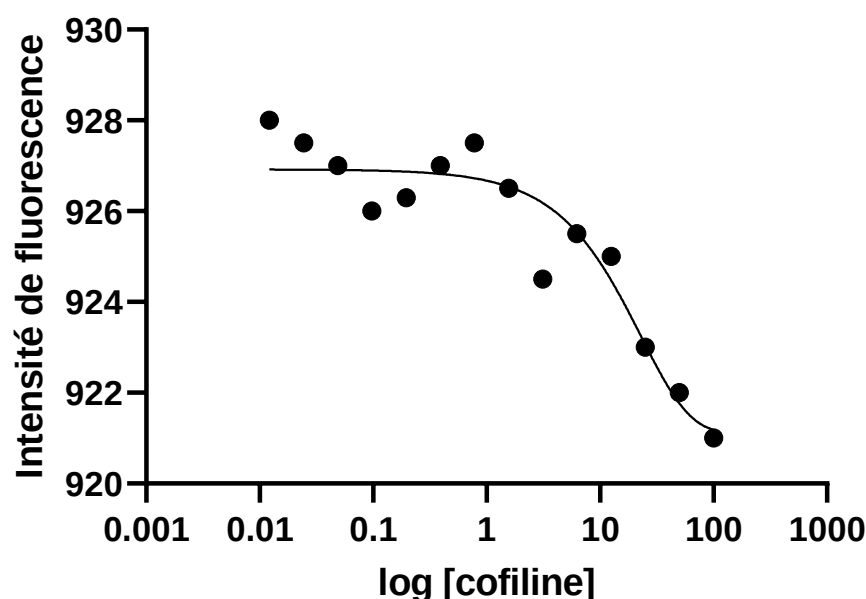


Figure 32 : Représentation du binding affinity entre LIMK2 et la cofiline.

Le lysat des HEK293 contenant miRFP670-LIMK2 a été préparé avec 30 % (v/v) de glycérol. Il a ensuite été dilué au 1/5^{ème} dans du tampon de lyse. Pour réaliser le binding affinity, il est nécessaire de préparer seize capillaires. Chaque capillaire contient une quantité fixe de LIMK2 pour une dilution finale au 1/10^{ème} et une quantité décroissante de cofiline, du capillaire 1 au capillaire 16. La cofiline a été préparée par dilutions en série au 1/2 dans son tampon de purification pour un volume final de 10 μ L. 10 μ L de LIMK2 ont ensuite été ajoutés à chaque dilution de cofiline pour un volume final de 20 μ L de solution préparée par capillaire. La mesure a été réalisée à 37°C. Le modèle de Hill a été utilisé pour ajuster nos mesures.

Par la suite, j'ai essayé de mesurer l'interaction entre le mutant miRFP670-LIMK2a-Y630A et la cofiline pour la comparer à l'interaction entre la protéine sauvage et la cofiline. Malheureusement, aucune des mesures que j'ai réalisées n'a été concluante et les conditions d'expérimentations n'ont pas pu être optimisées, faute de temps.

II.2.4. Conclusion

À ce jour, le K_D de l'interaction entre LIMK1/2 et la cofiline n'est pas connu. Ici, nous avons essayé de le déterminer en thermophorèse à micro-échelle, une méthode facile, rapide et sensible pour mesurer de façon quantitative des interactions entre biomolécules. L'idée était, par la suite, de tester l'affinité des mutants tirés de notre étude moléculaire

(LIMK2a-Y630A et LIMK2a-630F) pour la cofiline. En effet, nos résultats de co-immunoprécipitation indiquent que la mutation de la tyrosine 630 en alanine, si elle empêche l'activité de LIMK sur la cofiline, n'affecte pas sa capacité à interagir avec elle. Nous avons donc voulu nous en assurer par une autre méthode.

Nous avons obtenu de beaux résultats sur l'analyse de l'interaction entre la cofiline et LIMK2 sauvage, avec un K_D d'interaction estimé à 5 μ M. Toutefois, il aurait fallu avoir une préparation de cofiline plus concentrée pour pouvoir réellement observer l'effet dose-réponse aux concentrations les plus hautes du ligand, ce qui est susceptible de faire varier le K_D . Malheureusement, la purification dont nous disposions était trop faiblement concentrée (2,3 mg/mL) et, par ailleurs, a tendance à s'agréger ce qui a pu induire un biais dans la première mesure du *binding affinity*. Nous n'avons pas non plus été en mesure, par manque de temps, d'optimiser le signal MST pour mesurer l'interaction entre le mutant Y630A et la cofiline. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les résultats que nous avons obtenus. Première hypothèse : la protéine est instable, elle précipite et/ou s'agrége. Cette hypothèse correspondrait aux observations faites à l'issue de nos expériences de *cycloheximide chase assay* où nous avons observé que le mutant Y630A était moins stable que la protéine sauvage. Autre possibilité : la force ionique est trop faible pour cette protéine mutante et des agrégats se forment, rendant l'analyse en MST impossible. Il est admis que la concentration en sels et/ou en détergent permet de diminuer l'agrégation des protéines. Or, le tampon de purification de la cofiline, s'il contient du sel, ne contient pas de détergent.

III. Conclusion de l'Annexe 1

Les travaux menés dans le cadre de ce projet « MST » ont permis de faire la preuve de concept d'une nouvelle méthode d'analyse des interactions moléculaires entre les LIMKs ou leur domaine kinase de LIMK et de petites molécules inhibitrices. La MST est un outil extrêmement robuste dont l'utilisation est en pleine expansion. C'est une méthode d'analyse rapide et très sensible, qui permet de quantifier des interactions faibles entre molécules de nature variée et au sein de matrices complexes [189]. Dans le cadre de ces études, nous avons été en mesure de quantifier l'interaction entre les LIMKs ou leur domaine kinase et des petites molécules inhibitrices commerciales directement sur le lysat cellulaire. Cette méthode a notamment permis de nous affranchir de l'étape délicate de purification des LIM kinases [161,163,167,168]. La MST a aussi l'avantage de pouvoir

être effectuée sur de petites quantités d'échantillon [166] et sans nécessiter l'immobilisation de la molécule-cible [161,168]. Il faut toutefois que cette dernière soit marquée par un fluorophore, une étape absolument cruciale pour permettre son suivi en MST. Le choix du fluorophore, dans notre cas, était dépendant de l'appareil sur lequel se sont faites les analyses et des blocs LED dont il était équipé.

Dans le cadre de ce projet, quatre molécules inhibitrices de type « petite molécule chimique » ont été testées : LX7101, LIMKi3/BMS5, T56-LIMKi et TH-257. LX7101 est la seule molécule inhibitrice à avoir atteint le stade des essais cliniques jusqu'à présent, sans résultats publiés. LIMKi3/BMS5 est le premier inhibiteur qui a été développé pour cibler LIMK, en 2006. T56-LIMKi est un inhibiteur de LIMK modélisé d'après l'inhibiteur AWL-II-38.3, capable de bloquer le site actif de la protéine EphA3, laquelle partage 31% d'identité avec LIMK. Enfin, TH-257 est un inhibiteur de LIMK de dernière génération de type III ayant la particularité de ne pas se loger dans la poche catalytique de la protéine. Pour chacune de ces molécules, des données caractérisant leur interaction avec leur cible étaient publiées (IC_{50} pour LX7101, LIMKi3/BMS5 et T56-LIMKi, K_D pour TH-257), ce qui a permis de comparer nos résultats expérimentaux à ceux de la littérature. Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude sont très encourageants. Les valeurs de K_D des composés testés, déterminés grâce à la MST, sont du même ordre de grandeur que les IC_{50} et les K_D publiés dans la littérature pour ces mêmes composés. Ainsi, nous avons fait la preuve de concept de cette nouvelle méthode d'analyse de l'interaction entre les LIMKs et leurs ligands (inhibiteurs de type petite molécule chimique, cofiline...).

Dans l'ensemble, cette étude met en évidence que la MST est une méthode robuste pour obtenir des données quantitatives sur l'interaction entre des partenaires de nature différente, largement comparable aux méthodes utilisées actuellement (SPR, FRET, ITC, DLS). Elle a l'avantage de pouvoir s'effectuer directement sur des lysats cellulaires, au plus proche des conditions physiologiques, sans nécessité de purifier les molécules d'intérêt ou de les immobiliser. En outre, sa rapidité d'exécution, sa facilité d'utilisation en font une technique de choix pour le criblage de molécules à quasi-haut débit, un passage souvent obligatoire dans le développement de thérapies. La MST promet d'être, demain, un outil indispensable dans l'étude des interactions moléculaires dans la recherche clinique.

Annexe 2 : productions scientifiques

Publications

Villalonga E, Mosrin C, Normand T, Girardin C, Serrano A, Žunar B, Doudeau M, Godin F, Bénédicti H, Vallée B. LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features. *Cells*. 2023 Mar 4;12(5):805. doi: 10.3390/cells12050805. PMID: 36899941; PMCID: PMC10000741.

Revue publiée dans *Cells*, intégrée au chapitre I de l'introduction.

Posters

E. Villalonga, C. Chalal, D. Cassas, M. Doudeau, F. Godin, H. Bénédicti, B. Vallée, New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, FEBS Meeting 2021, 3-8 juillet 2021, Ljubljana, Slovénie.

E. Villalonga, C. Chalal, D. Cassas, M. Doudeau, F. Godin, H. Bénédicti, B. Vallée, New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, 33ème Colloque Biotechnocentre, 7-8 octobre 2021, Orléans.

E. Villalonga, C. Chalal, D. Cassas, M. Doudeau, F. Godin, H. Bénédicti, B. Vallée, New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, Congrès annuel SFBBM, 4-5 juillet 2022, Paris.

E. Villalonga, C. Chalal, D. Cassas, M. Doudeau, F. Godin, H. Bénédicti, B. Vallée, New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, Journée Scientifique de la Fédération de Recherche Physique et Chimie du Vivant, 30 août 2022, Orléans.

E. Villalonga, C. Chalal, D. Cassas, M. Doudeau, F. Godin, H. Bénédicti, B. Vallée, New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, FEBS Meeting 2021, 8-12 juillet 2023, Tours, France.

Communications orales

New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, séminaire interne des doctorants de 2ème année, 10 juin 2022, Orléans.

New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, 34ème Colloque Biotechnocentre, 20-21 Octobre 2022, Nouan-le-Fuzelier (**prix communication orale**).

New insights into the regulation of actin cytoskeleton dynamics via the Rho/ROCK/LIMK2/cofilin signalling pathway: a novel mechanism of regulation of cofilin by LIMK2, FEBS Meeting 2021, 8-12 juillet 2023, Tours, France.

Annexe 3 : encadrement de stage et enseignements

Stages

■ 2021 : encadrement de Mélanie Rapeto, stagiaire de Master 2 BBMC. Stage financé par la fédération de recherche CBM/ICOA.

■ 2022 : encadrement de Marion Martins, stagiaire de Master 2 BBMC. Stage financé par la fédération de recherche CBM/ICOA.

Missions complémentaires

■ Licence 2 Sciences du vivant

Encadrement des travaux pratiques de microbiologie (32 h)

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (depuis octobre 2023)

■ **Licence 2 Sciences du vivant**

Microbiologie générale :

- Travaux pratiques (32 h)

Bases fondamentales de la Biologie Moléculaire

- Travaux dirigés (38 h)

Techniques de Biologie Moléculaire :

- Cours magistral (2 h)
- Travaux dirigés (42 h)
- Travaux pratiques (48 h)

■ **Licence 3 Sciences du vivant**

Immunologie générale :

- Travaux dirigés (24 h)

Biologie moléculaire et évolutive :

- Travaux dirigés (16 h)

Service total : 176 heures

Annexe 4 : formations suivies au cours de la thèse

Catégorie : Anglais

- CV vidéo en anglais + Différences culturelles et intégration à l'étranger (15 mai 2023 - 25 mai 2023) S211 et S110 bât Enseignement Général des Sciences, UFR ST
- Entraînement à la prise de parole et à la communication scientifique orale (23 mai 2023 - 13 juin 2023) Laboratoire multimédia Bâtiment Sciences S 310 et S 311

Catégorie : Cycle de conférences

- Le Temps, l'Énergie, la Lumière, l'Univers : Quelles limites vers l'infiniment petit et vers l'infiniment grand ? (05 juin 2023 - 7 juin 2023)

Catégorie : Éthique, recherche et intégrité scientifique

- Ethique et intégrité scientifique (09 décembre 2021) Amphithéâtre Cabannes. 8 rue Léonard de Vinci - site De Vinci

Catégorie : Outils techniques

- Biostatistique avec R (11 janvier 2022 - 25 janvier 2022) Salle LR 201 - Faculté de Médecine- Site La Riche - 10 rue Emile Aron - 37520 La Riche
- Introduction au Traitement d'Images avec Matlab (20 juin 2022 - 28 juin 2022) Teams

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

1. Villalonga, E.; Mosrin, C.; Normand, T.; Girardin, C.; Serrano, A.; Žunar, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Bénédicti, H.; Vallée, B. LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features. *Cells* **2023**, *12*, 805, doi:10.3390/cells12050805.
2. Manetti, F. LIM Kinases Are Attractive Targets with Many Macromolecular Partners and Only a Few Small Molecule Regulators: LIM KINASES ARE ATTRACTIVE TARGETS. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 968–998, doi:10.1002/med.20230.
3. Prunier, C.; Prudent, R.; Kapur, R.; Sadoul, K.; Lafanechère, L. LIM Kinases: Cofilin and Beyond. *Oncotarget* **2017**, *8*, 41749–41763, doi:10.18632/oncotarget.16978.
4. Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance. *Oncogene* **2012**, *31*, 1869–1883, doi:10.1038/onc.2011.384.
5. Mosca, L.; Ilari, A.; Fazi, F.; Assaraf, Y.G.; Colotti, G. Taxanes in Cancer Treatment: Activity, Chemoresistance and Its Overcoming. *Drug Resistance Updates* **2021**, *54*, 100742, doi:10.1016/j.drug.2020.100742.
6. Berabez, R.; Routier, S.; Bénédicti, H.; Plé, K.; Vallée, B. LIM Kinases, Promising but Reluctant Therapeutic Targets: Chemistry and Preclinical Validation In Vivo. *Cells* **2022**, *11*, 2090, doi:10.3390/cells11132090.
7. Wroblewski, S.T.; Lin, S.; Leftheris, K.; He, L.; Seitz, S.P.; Lin, T.-A.; Vaccaro, W. Phenyl-Substituted Pyrimidine Compounds Useful as Kinase Inhibitors 2006.
8. Ross-Macdonald, P.; de Silva, H.; Guo, Q.; Xiao, H.; Hung, C.-Y.; Penhallow, B.; Markwalder, J.; He, L.; Attar, R.M.; Lin, T.; et al. Identification of a Nonkinase Target Mediating Cytotoxicity of Novel Kinase Inhibitors. *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 3490–3498, doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0826.
9. Li, R.; Doherty, J.; Antonipillai, J.; Chen, S.; Devlin, M.; Visser, K.; Baell, J.; Street, I.; Anderson, R.L.; Bernard, O. LIM Kinase Inhibition Reduces Breast Cancer Growth and Invasiveness but Systemic Inhibition Does Not Reduce Metastasis in Mice. *Clin Exp Metastasis* **2013**, *30*, 483–495, doi:10.1007/s10585-012-9553-6.
10. Medina, C.; de la Fuente, V.; tom Dieck, S.; Nassim-Assir, B.; Dalmay, T.; Bartnik, I.; Lunardi, P.; de Oliveira Alvares, L.; Schuman, E.M.; Letzkus, J.J.; et al. LIMK, Cofilin 1 and Actin Dynamics Involvement in Fear Memory Processing. *Neurobiology of Learning and Memory* **2020**, *173*, 107275, doi:10.1016/j.nlm.2020.107275.
11. Yang, X.; He, G.; Zhang, X.; Chen, L.; Kong, Y.; Xie, W.; Jia, Z.; Liu, W.-T.; Zhou, Z. Transient Inhibition of LIMKs Significantly Attenuated Central Sensitization and Delayed the Development of Chronic Pain. *Neuropharmacology* **2017**, *125*, 284–294, doi:10.1016/j.neuropharm.2017.06.031.
12. Harrison, B.A.; Whitlock, N.A.; Voronkov, M.V.; Almstead, Z.Y.; Gu, K.; Mabon, R.; Gardyan, M.; Hamman, B.D.; Allen, J.; Gopinathan, S.; et al. Novel Class of LIM-

- Kinase 2 Inhibitors for the Treatment of Ocular Hypertension and Associated Glaucoma. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6515–6518, doi:10.1021/jm901226j.
13. Harrison, B.A.; Almstead, Z.Y.; Burgoon, H.; Gardyan, M.; Goodwin, N.C.; Healy, J.; Liu, Y.; Mabon, R.; Marinelli, B.; Samala, L.; et al. Discovery and Development of LX7101, a Dual LIM-Kinase and ROCK Inhibitor for the Treatment of Glaucoma. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6, 84–88, doi:10.1021/ml500367g.
 14. Lexicon Pharmaceuticals *A Phase 1/2a, Randomized, Parallel-Group, Double-Masked, Vehicle-Controlled, Dose-Frequency Escalation Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Intraocular Pressure (IOP)-Lowering Efficacy of Topically Administered LX7101 in Subjects Diagnosed With Primary Open-Angle Glaucoma (POAG) or Ocular Hypertension (OHT)*; clinicaltrials.gov, 2015;
 15. Malvi, P.; Janostiak, R.; Chava, S.; Manrai, P.; Yoon, E.; Singh, K.; Harigopal, M.; Gupta, R.; Wajapeyee, N. LIMK2 Promotes the Metastatic Progression of Triple-Negative Breast Cancer by Activating SRPK1. *Oncogenesis* **2020**, 9, 77, doi:10.1038/s41389-020-00263-1.
 16. Rivalle, C.; Wendling, F.; Tambourin, P.; Lhoste, J.M.; Bisagni, E.; Chermann, J.C. Antitumor Amino-Substituted Pyrido[3',4':4,5]Pyrrolo[2,3-g]Isoquinolines and Pyrido[4,3-b]Carbazole Derivatives: Synthesis and Evaluation of Compounds Resulting from New Side Chain and Heterocycle Modifications. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 181–185, doi:10.1021/jm00356a012.
 17. Prudent, R.; Vassal-Stermann, E.; Nguyen, C.-H.; Pillet, C.; Martinez, A.; Prunier, C.; Barette, C.; Soleilhac, E.; Filhol, O.; Beghin, A.; et al. Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Stabilizes Microtubules and Inhibits Neoplastic Growth. *Cancer Res* **2012**, 72, 4429–4439, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3342.
 18. Prunier, C.; Josserand, V.; Vollaie, J.; Beerling, E.; Petropoulos, C.; Destaing, O.; Montemagno, C.; Hurbin, A.; Prudent, R.; de Koning, L.; et al. LIM Kinase Inhibitor Pyr1 Reduces the Growth and Metastatic Load of Breast Cancers. *Cancer Res* **2016**, 76, 3541–3552, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1864.
 19. Gory-Fauré, S.; Powell, R.; Jonckheere, J.; Lanté, F.; Denarier, E.; Peris, L.; Nguyen, C.H.; Buisson, A.; Lafanechère, L.; Andrieux, A. Pyr1-Mediated Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Restores Synaptic Plasticity and Normal Behavior in a Mouse Model of Schizophrenia. *Front. Pharmacol.* **2021**, 12, 627995, doi:10.3389/fphar.2021.627995.
 20. Mashiach-Farkash, E.; Rak, R.; Elad-Sfadia, G.; Haklai, R.; Carmeli, S.; Kloog, Y.; Wolfson, H.J. Computer-Based Identification of a Novel LIMK1/2 Inhibitor That Synergizes with Salirasib to Destabilize the Actin Cytoskeleton. *Oncotarget* **2012**, 3, 629–639, doi:10.18632/oncotarget.525.
 21. Choi, Y.; Syeda, F.; Walker, J.R.; Finerty, P.J.; Cuerrrier, D.; Wojciechowski, A.; Liu, Q.; Dhe-Paganon, S.; Gray, N.S. Discovery and Structural Analysis of Eph Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 4467–4470, doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.029.
 22. Starinsky-Elbaz, S.; Faigenbloom, L.; Friedman, E.; Stein, R.; Kloog, Y. The Pre-GAP-Related Domain of Neurofibromin Regulates Cell Migration through the LIM

- Kinase/Cofilin Pathway. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2009**, *42*, 278–287, doi:10.1016/j.mcn.2009.07.014.
23. Rak, R.; Haklai, R.; Elad-Tzfadia, G.; Wolfson, H.J.; Carmeli, S.; Kloog, Y. Novel LIMK2 Inhibitor Blocks Panc-1 Tumor Growth in a Mouse Xenograft Model. *Oncoscience* **2014**, *1*, 39–48, doi:10.18632/oncoscience.7.
 24. Demyanenko, S.V.; Uzdensky, A. LIM Kinase Inhibitor T56-LIMKi Protects Mouse Brain from Photothrombotic Stroke. *Brain Injury* **2021**, *35*, 490–500, doi:10.1080/02699052.2021.1879397.
 25. Berrou, J.; Dupont, M.; Djamai, H.; Adicéam, E.; Parietti, V.; Kaci, A.; Clappier, E.; Cayuela, J.-M.; Baruchel, A.; Paublant, F.; et al. Preclinical Evaluation of a Novel Small Molecule Inhibitor of LIM Kinases (LIMK) CEL_Amide in Philadelphia-Chromosome Positive (BCR::ABL+) Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *JCM* **2022**, *11*, 6761, doi:10.3390/jcm11226761.
 26. Djamai, H.; Berrou, J.; Dupont, M.; Kaci, A.; Ehlert, J.E.; Weber, H.; Baruchel, A.; Paublant, F.; Prudent, R.; Gardin, C.; et al. Synergy of FLT3 Inhibitors and the Small Molecule Inhibitor of LIM Kinase1/2 CEL_Amide in FLT3-ITD Mutated Acute Myeloblastic Leukemia (AML) Cells. *Leukemia Research* **2021**, *100*, 106490, doi:10.1016/j.leukres.2020.106490.
 27. Ohashi, K.; Sampei, K.; Nakagawa, M.; Uchiumi, N.; Amanuma, T.; Aiba, S.; Oikawa, M.; Mizuno, K. Damnacanthal, an Effective Inhibitor of LIM-Kinase, Inhibits Cell Migration and Invasion. *MBoC* **2014**, *25*, 828–840, doi:10.1091/mbc.e13-09-0540.
 28. Collins, R.; Lee, H.; Jones, D.H.; Elkins, J.M.; Gillespie, J.A.; Thomas, C.; Baldwin, A.G.; Jones, K.; Waters, L.; Paine, M.; et al. Comparative Analysis of Small-Molecule LIMK1/2 Inhibitors: Chemical Synthesis, Biochemistry, and Cellular Activity. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 13705–13713, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00751.
 29. Ubersax, J.A.; Ferrell Jr, J.E. Mechanisms of Specificity in Protein Phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 530–541, doi:10.1038/nrm2203.
 30. Okano, I.; Hiraoka, J.; Otera, H.; Nunoue, K.; Ohashi, K.; Iwashita, S.; Hirai, M.; Mizuno, K. Identification and Characterization of a Novel Family of Serine/Threonine Kinases Containing Two N-Terminal LIM Motifs. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 31321–31330, doi:10.1074/jbc.270.52.31321.
 31. Miller, C.J.; Turk, B.E. Homing in: Mechanisms of Substrate Targeting by Protein Kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **2018**, *43*, 380–394, doi:10.1016/j.tibs.2018.02.009.
 32. Chatterjee, D.; Preuss, F.; Dederer, V.; Knapp, S.; Mathea, S. Structural Aspects of LIMK Regulation and Pharmacology. *Cells* **2022**, *11*, 142, doi:10.3390/cells11010142.
 33. Agnew, B.J.; Minamide, L.S.; Bamburg, J.R. Reactivation of Phosphorylated Actin Depolymerizing Factor and Identification of the Regulatory Site. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 17582–17587, doi:10.1074/jbc.270.29.17582.

34. Hamill, S.; Lou, H.J.; Turk, B.E.; Boggon, T.J. Structural Basis for Noncanonical Substrate Recognition of Cofilin/ADF Proteins by LIM Kinases. *Molecular Cell* **2016**, *62*, 397–408, doi:10.1016/j.molcel.2016.04.001.
35. Salah, E.; Chatterjee, D.; Beltrami, A.; Tumber, A.; Preuss, F.; Canning, P.; Chaikuad, A.; Knaus, P.; Knapp, S.; Bullock, A.N.; et al. Lessons from LIMK1 Enzymology and Their Impact on Inhibitor Design. *Biochemical Journal* **2019**, *476*, 3197–3209, doi:10.1042/BCJ20190517.
36. Smith, M.C.; Gestwicki, J.E. Features of Protein–Protein Interactions That Translate into Potent Inhibitors: Topology, Surface Area and Affinity. *Expert Rev. Mol. Med.* **2012**, *14*, e16, doi:10.1017/erm.2012.10.
37. Tsomaia, N. Peptide Therapeutics: Targeting the Undruggable Space. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *94*, 459–470, doi:10.1016/j.ejmech.2015.01.014.
38. Cheng, A.C.; Coleman, R.G.; Smyth, K.T.; Cao, Q.; Soulard, P.; Caffrey, D.R.; Salzberg, A.C.; Huang, E.S. Structure-Based Maximal Affinity Model Predicts Small-Molecule Druggability. *Nat Biotechnol* **2007**, *25*, 71–75, doi:10.1038/nbt1273.
39. Leader, B.; Baca, Q.J.; Golan, D.E. Protein Therapeutics: A Summary and Pharmacological Classification. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 21–39, doi:10.1038/nrd2399.
40. Ivanov, A.A.; Khuri, F.R.; Fu, H. Targeting Protein–Protein Interactions as an Anticancer Strategy. *Trends in Pharmacological Sciences* **2013**, *34*, 393–400, doi:10.1016/j.tips.2013.04.007.
41. Leão, M.; Pereira, C.; Bisio, A.; Ciribilli, Y.; Paiva, A.M.; Machado, N.; Palmeira, A.; Fernandes, M.X.; Sousa, E.; Pinto, M.; et al. Discovery of a New Small-Molecule Inhibitor of P53–MDM2 Interaction Using a Yeast-Based Approach. *Biochemical Pharmacology* **2013**, *85*, 1234–1245, doi:10.1016/j.bcp.2013.01.032.
42. Thanos, C.D.; DeLano, W.L.; Wells, J.A. Hot-Spot Mimicry of a Cytokine Receptor by a Small Molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 15422–15427, doi:10.1073/pnas.0607058103.
43. Moon, H.; Lim, H.-S. Synthesis and Screening of Small-Molecule α -Helix Mimetic Libraries Targeting Protein–Protein Interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **2015**, *24*, 38–47, doi:10.1016/j.cbpa.2014.10.023.
44. Ali, A.M.; Atmaj, J.; Van Oosterwijk, N.; Groves, M.R.; Dömling, A. Stapled Peptides Inhibitors: A New Window for Target Drug Discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2019**, *17*, 263–281, doi:10.1016/j.csbj.2019.01.012.
45. Guharoy, M.; Chakrabarti, P. Secondary Structure Based Analysis and Classification of Biological Interfaces: Identification of Binding Motifs in Protein–Protein Interactions. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1909–1918, doi:10.1093/bioinformatics/btm274.
46. Li, X.; Chen, S.; Zhang, W.-D.; Hu, H.-G. Stapled Helical Peptides Bearing Different Anchoring Residues. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 10079–10144, doi:10.1021/acs.chemrev.0c00532.

47. Schafmeister, C.E.; Po, J.; Verdine, G.L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891–5892, doi:10.1021/ja000563a.
48. Dougherty, P.G.; Sahni, A.; Pei, D. Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10241–10287, doi:10.1021/acs.chemrev.9b00008.
49. Bird, G.H.; Bernal, F.; Pitter, K.; Walensky, L.D. Synthesis and Biophysical Characterization of Stabilized α -Helices of BCL-2 Domains. *Methods Enzymol* **2008**, *446*, 369–386, doi:10.1016/S0076-6879(08)01622-4.
50. Tan, Y.S.; Lane, D.P.; Verma, C.S. Stapled Peptide Design: Principles and Roles of Computation. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 1642–1653, doi:10.1016/j.drudis.2016.06.012.
51. Bird, G.H.; Mazzola, E.; Opoku-Nsiah, K.; Lammert, M.A.; Godes, M.; Neuberger, D.S.; Walensky, L.D. Biophysical Determinants for Cellular Uptake of Hydrocarbon-Stapled Peptide Helices. *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 845–852, doi:10.1038/nchembio.2153.
52. Kumita, J.R.; Smart, O.S.; Woolley, G.A. Photo-Control of Helix Content in a Short Peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 3803–3808, doi:10.1073/pnas.97.8.3803.
53. Fairlie, D.P.; Dantas De Araujo, A. Stapling Peptides Using Cysteine Crosslinking. *Biopolymers* **2016**, *106*, 843–852, doi:10.1002/bip.22877.
54. Giordanetto, F.; Revell, J.D.; Knerr, L.; Hostettler, M.; Paunovic, A.; Priest, C.; Janefeldt, A.; Gill, A. Stapled Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Derivatives Improve VPAC2 Agonism and Glucose-Dependent Insulin Secretion. *ACS Med Chem Lett* **2013**, *4*, 1163–1168, doi:10.1021/ml400257h.
55. Cromm, P.M.; Spiegel, J.; Kuchler, P.; Dietrich, L.; Kriegesmann, J.; Wendt, M.; Goody, R.S.; Waldmann, H.; Grossmann, T.N. Protease-Resistant and Cell-Permeable Double-Stapled Peptides Targeting the Rab8a GTPase. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2375–2382, doi:10.1021/acschembio.6b00386.
56. Jelinska, C.; Kannan, S.; Frosi, Y.; Ramlan, S.R.; Winnerdy, F.; Lakshminarayanan, R.; Brown, C.J.; Phan, A.-T.; Rhodes, D.; Verma, C. *Stitched Peptides as Potential Cell Permeable Inhibitors of Oncogenic DAXX Protein*; Biochemistry, 2022;
57. Jelinska, C.; Kannan, S.; Frosi, Y.; Ramlan, S.R.; Winnerdy, F.; Lakshminarayanan, R.; Johannes, C.W.; Brown, C.J.; Phan, A.-T.; Rhodes, D.; et al. Stitched Peptides as Potential Cell Permeable Inhibitors of Oncogenic DAXX Protein. *RSC Chem. Biol.* **2023**, *4*, 1096–1110, doi:10.1039/D3CB00149K.
58. Speltz, T.E.; Mayne, C.G.; Fanning, S.W.; Siddiqui, Z.; Tajkhorshid, E.; Greene, G.L.; Moore, T.W. A “Cross-Stitched” Peptide with Improved Helicity and Proteolytic Stability. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 3702–3706, doi:10.1039/C8OB00790J.
59. Guerlavais, V.; Sawyer, T.K.; Carvajal, L.; Chang, Y.S.; Graves, B.; Ren, J.-G.; Sutton, D.; Olson, K.A.; Packman, K.; Darlak, K.; et al. Discovery of Sulanemadlin (ALRN-6924), the First Cell-Permeating, Stabilized α -Helical Peptide in Clinical

- Development. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 9401–9417, doi:10.1021/acs.jmedchem.3c00623.
60. Arber, S.; Barbayannis, F.A.; Hanser, H.; Schneider, C.; Stanyon, C.A.; Bernard, O.; Caroni, P. Regulation of Actin Dynamics through Phosphorylation of Cofilin by LIM-Kinase. *Nature* **1998**, *393*, 805–809, doi:10.1038/31729.
 61. Sumi, T.; Matsumoto, K.; Takai, Y.; Nakamura, T. Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-Activated Lim-Kinase 2. *Journal of Cell Biology* **1999**, *147*, 1519–1532, doi:10.1083/jcb.147.7.1519.
 62. Yang, N.; Higuchi, O.; Ohashi, K.; Nagata, K.; Wada, A.; Kangawa, K.; Nishida, E.; Mizuno, K. Cofilin Phosphorylation by LIM-Kinase 1 and Its Role in Rac-Mediated Actin Reorganization. *Nature* **1998**, *393*, 809–812, doi:10.1038/31735.
 63. Foletta, V.C.; Moussi, N.; Sarmiere, P.D.; Bamburg, J.R.; Bernard, O. LIM Kinase 1, a Key Regulator of Actin Dynamics, Is Widely Expressed in Embryonic and Adult Tissues. *Experimental Cell Research* **2004**, *294*, 392–405, doi:10.1016/j.yexcr.2003.11.024.
 64. Gorovoy, M.; Niu, J.; Bernard, O.; Profirovic, J.; Minshall, R.; Neamu, R.; Voynoy-Yasenetskaya, T. LIM Kinase 1 Coordinates Microtubule Stability and Actin Polymerization in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 26533–26542, doi:10.1074/jbc.M502921200.
 65. Hsu, F.-F.; Lin, T.-Y.; Chen, J.-Y.; Shieh, S.-Y. P53-Mediated Transactivation of LIMK2b Links Actin Dynamics to Cell Cycle Checkpoint Control. *Oncogene* **2010**, *29*, 2864–2876, doi:10.1038/onc.2010.40.
 66. Chakrabarti, R.; Jones, J.L.; Oelschlager, D.K.; Tapia, T.; Tousson, A.; Grizzle, W.E. Phosphorylated LIM Kinases Colocalize with Gamma-Tubulin in Centrosomes During Early Stages of Mitosis. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 2944–2952, doi:10.4161/cc.6.23.4957.
 67. Sumi, T.; Matsumoto, K.; Nakamura, T. Mitosis-Dependent Phosphorylation and Activation of LIM-Kinase 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *290*, 1315–1320, doi:10.1006/bbrc.2002.6346.
 68. Amano, T.; Kaji, N.; Ohashi, K.; Mizuno, K. Mitosis-Specific Activation of LIM Motif-Containing Protein Kinase and Roles of Cofilin Phosphorylation and Dephosphorylation in Mitosis. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 22093–22102, doi:10.1074/jbc.M201444200.
 69. Kaji, N.; Muramoto, A.; Mizuno, K. LIM Kinase-Mediated Cofilin Phosphorylation during Mitosis Is Required for Precise Spindle Positioning. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 4983–4992, doi:10.1074/jbc.M708644200.
 70. Sumi, T.; Hashigasako, A.; Matsumoto, K.; Nakamura, T. Different Activity Regulation and Subcellular Localization of LIMK1 and LIMK2 during Cell Cycle Transition. *Experimental Cell Research* **2006**, *312*, 1021–1030, doi:10.1016/j.yexcr.2005.12.030.
 71. Kobayashi, M.; Nishita, M.; Mishima, T.; Ohashi, K.; Mizuno, K. MAPKAPK-2-Mediated LIM-Kinase Activation Is Critical for VEGF-Induced Actin Remodeling and Cell Migration. *EMBO J* **2006**, *25*, 713–726, doi:10.1038/sj.emboj.7600973.

72. Côté, M.C.; Lavoie, J.R.; Houle, F.; Poirier, A.; Rousseau, S.; Huot, J. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration by LIM Kinase 1-Mediated Phosphorylation of Annexin 1. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 8013–8021, doi:10.1074/jbc.M109.098665.
73. Nishita, M.; Tomizawa, C.; Yamamoto, M.; Horita, Y.; Ohashi, K.; Mizuno, K. Spatial and Temporal Regulation of Cofilin Activity by LIM Kinase and Slingshot Is Critical for Directional Cell Migration. *Journal of Cell Biology* **2005**, *171*, 349–359, doi:10.1083/jcb.200504029.
74. Zhang, H.; Ben Zablah, Y.; Liu, A.; Lee, D.; Zhang, H.; Meng, Y.; Zhou, C.; Liu, X.; Wang, Y.; Jia, Z. Overexpression of LIMK1 in Hippocampal Excitatory Neurons Improves Synaptic Plasticity and Social Recognition Memory in APP/PS1 Mice. *Mol Brain* **2021**, *14*, 121, doi:10.1186/s13041-021-00833-3.
75. Mao, R.; Deng, R.; Wei, Y.; Han, L.; Meng, Y.; Xie, W.; Jia, Z. LIMK1 and LIMK2 Regulate Cortical Development through Affecting Neural Progenitor Cell Proliferation and Migration. *Mol Brain* **2019**, *12*, 67, doi:10.1186/s13041-019-0487-7.
76. Yang, E.J.; Yoon, J.-H.; Min, D.S.; Chung, K.C. LIM Kinase 1 Activates cAMP-Responsive Element-Binding Protein during the Neuronal Differentiation of Immortalized Hippocampal Progenitor Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 8903–8910, doi:10.1074/jbc.M311913200.
77. Cuberos, H.; Vallée, B.; Vourc'h, P.; Tastet, J.; Andres, C.R.; Bénédicti, H. Roles of LIM Kinases in Central Nervous System Function and Dysfunction. *FEBS Lett* **2015**, *589*, 3795–3806, doi:10.1016/j.febslet.2015.10.032.
78. Ben Zablah, Y.; Zhang, H.; Gugustea, R.; Jia, Z. LIM-Kinases in Synaptic Plasticity, Memory, and Brain Diseases. *Cells* **2021**, *10*, 2079, doi:10.3390/cells10082079.
79. Halasz, E.; Townes-Anderson, E.; Wang, W. LIM Kinases in Synaptic Plasticity and Their Potential as Therapeutic Targets. *Neural Regen Res* **2020**, *15*, 1471, doi:10.4103/1673-5374.274333.
80. Meng, Y.; Zhang, Y.; Tregubov, V.; Janus, C.; Cruz, L.; Jackson, M.; Lu, W.Y.; MacDonald, J.F.; Wang, J.Y.; Falls, D.L.; et al. Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice. *Neuron* **2002**, *35*, 121–133, doi:10.1016/s0896-6273(02)00758-4.
81. Papadopoulou, N.; Charalampopoulos, I.; Alevizopoulos, K.; Gravanis, A.; Stournaras, C. Rho/ROCK/Actin Signaling Regulates Membrane Androgen Receptor Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Experimental Cell Research* **2008**, *314*, 3162–3174, doi:10.1016/j.yexcr.2008.07.012.
82. Ivanovska, J.; Tregubova, A.; Mahadevan, V.; Chakilam, S.; Gandesiri, M.; Benderska, N.; Ettle, B.; Hartmann, A.; Söder, S.; Ziesché, E.; et al. Identification of DAPK as a Scaffold Protein for the LIMK/Cofilin Complex in TNF-Induced Apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2013**, *45*, 1720–1729, doi:10.1016/j.biocel.2013.05.013.

83. Tomiyoshi, G.; Horita, Y.; Nishita, M.; Ohashi, K.; Mizuno, K. Caspase-Mediated Cleavage and Activation of LIM-Kinase 1 and Its Role in Apoptotic Membrane Blebbing. *Genes Cells* **2004**, *9*, 591–600, doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00745.x.
84. Ko, A.-R.; Hyun, H.-W.; Min, S.-J.; Kim, J.-E.; Kang, T.-C. Endothelin-1 Induces LIMK2-Mediated Programmed Necrotic Neuronal Death Independent of NOS Activity. *Mol Brain* **2015**, *8*, 58, doi:10.1186/s13041-015-0149-3.
85. Yoshioka, K.; Foletta, V.; Bernard, O.; Itoh, K. A Role for LIM Kinase in Cancer Invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 7247–7252, doi:10.1073/pnas.1232344100.
86. You, T.; Gao, W.; Wei, J.; Jin, X.; Zhao, Z.; Wang, C.; Li, Y. Overexpression of LIMK1 Promotes Tumor Growth and Metastasis in Gastric Cancer. *Biomed Pharmacother* **2015**, *69*, 96–101, doi:10.1016/j.biopha.2014.11.011.
87. Zhang, H.; Wang, Y.; Xing, F.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, H.; Yang, Y.; Gao, Z. Overexpression of LIMK1 Promotes Migration Ability of Multidrug-Resistant Osteosarcoma Cells. *oncol res* **2011**, *19*, 501–509, doi:10.3727/096504012X13286534482511.
88. Nikhil, K.; Chang, L.; Viccaro, K.; Jacobsen, M.; McGuire, C.; Satapathy, S.R.; Tandiyar, M.; Broman, M.M.; Cresswell, G.; He, Y.J.; et al. Identification of LIMK2 as a Therapeutic Target in Castration Resistant Prostate Cancer. *Cancer Letters* **2019**, *448*, 182–196, doi:10.1016/j.canlet.2019.01.035.
89. Nikhil, K.; Kamra, M.; Raza, A.; Shah, K. Negative Cross Talk between LIMK2 and PTEN Promotes Castration Resistant Prostate Cancer Pathogenesis in Cells and in Vivo. *Cancer Letters* **2021**, *498*, 1–18, doi:10.1016/j.canlet.2020.09.010.
90. Ahmed, T.; Shea, K.; Masters, J.R.W.; Jones, G.E.; Wells, C.M. A PAK4-LIMK1 Pathway Drives Prostate Cancer Cell Migration Downstream of HGF. *Cell Signal* **2008**, *20*, 1320–1328, doi:10.1016/j.cellsig.2008.02.021.
91. Jensen, P.; Carlet, M.; Schlenk, R.F.; Weber, A.; Kress, J.; Brunner, I.; Słabicki, M.; Grill, G.; Weisemann, S.; Cheng, Y.-Y.; et al. Requirement for LIM Kinases in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* **2020**, *34*, 3173–3185, doi:10.1038/s41375-020-0943-5.
92. Taylor, M.P.; Koyuncu, O.O.; Enquist, L.W. Subversion of the Actin Cytoskeleton during Viral Infection. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9*, 427–439, doi:10.1038/nrmicro2574.
93. Walsh, D.; Naghavi, M.H. Exploitation of Cytoskeletal Networks during Early Viral Infection. *Trends in Microbiology* **2019**, *27*, 39–50, doi:10.1016/j.tim.2018.06.008.
94. Vorster, P.J.; Guo, J.; Yoder, A.; Wang, W.; Zheng, Y.; Xu, X.; Yu, D.; Spear, M.; Wu, Y. LIM Kinase 1 Modulates Cortical Actin and CXCR4 Cycling and Is Activated by HIV-1 to Initiate Viral Infection. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 12554–12564, doi:10.1074/jbc.M110.182238.
95. Gladnikoff, M.; Shimoni, E.; Gov, N.S.; Rousso, I. Retroviral Assembly and Budding Occur through an Actin-Driven Mechanism. *Biophysical Journal* **2009**, *97*, 2419–2428, doi:10.1016/j.bpj.2009.08.016.

96. Manetti, F. HIV-1 Proteins Join the Family of LIM Kinase Partners. New Roads Open up for HIV-1 Treatment. *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 81–88, doi:10.1016/j.drudis.2011.08.004.
97. Heredia, L.; Helguera, P.; de Olmos, S.; Kedikian, G.; Sola Vigo, F.; LaFerla, F.; Staufenbiel, M.; de Olmos, J.; Busciglio, J.; Caceres, A.; et al. Phosphorylation of Actin-Depolymerizing Factor/Cofilin by LIM-Kinase Mediates Amyloid β -Induced Degeneration: A Potential Mechanism of Neuronal Dystrophy in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 6533–6542, doi:10.1523/JNEUROSCI.5567-05.2006.
98. Mendoza-Naranjo, A.; Contreras-Vallejos, E.; Henriquez, D.R.; Otth, C.; Bamburg, J.R.; Maccioni, R.B.; Gonzalez-Billault, C. Fibrillar Amyloid- β 1-42 Modifies Actin Organization Affecting the Cofilin Phosphorylation State: A Role for Rac1/Cdc42 Effector Proteins and the Slingshot Phosphatase. *15*.
99. Rush, T.; Martinez-Hernandez, J.; Dollmeyer, M.; Frandemiche, M.L.; Borel, E.; Boisseau, S.; Jacquier-Sarlin, M.; Buisson, A. Synaptotoxicity in Alzheimer's Disease Involved a Dysregulation of Actin Cytoskeleton Dynamics through Cofilin 1 Phosphorylation. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 10349–10361, doi:10.1523/JNEUROSCI.1409-18.2018.
100. Henderson, B.W.; Gentry, E.G.; Rush, T.; Troncoso, J.C.; Thambisetty, M.; Montine, T.J.; Herskowitz, J.H. Rho-Associated Protein Kinase 1 (ROCK1) Is Increased in Alzheimer's Disease and ROCK1 Depletion Reduces Amyloid- β Levels in Brain. *J. Neurochem.* **2016**, *138*, 525–531, doi:10.1111/jnc.13688.
101. Yan, M.; Meng, L.; Dai, L.; Zhang, X.; Chen, G.; Zheng, Y.; Zha, Y.; Zeng, Y.; Zhang, Z. Cofilin 1 Promotes the Aggregation and Cell-to-Cell Transmission of α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Biochem Biophys Res Commun* **2020**, *529*, 1053–1060, doi:10.1016/j.bbrc.2020.06.101.
102. Lim, M.K.; Kawamura, T.; Ohsawa, Y.; Ohtsubo, M.; Asakawa, S.; Takayanagi, A.; Shimizu, N. Parkin Interacts with LIM Kinase 1 and Reduces Its Cofilin-Phosphorylation Activity via Ubiquitination. *Experimental Cell Research* **2007**, *313*, 2858–2874, doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.016.
103. Bergoug, M.; Doudeau, M.; Godin, F.; Mosrin, C.; Vallée, B.; Bénédicti, H. Neurofibromin Structure, Functions and Regulation. *Cells* **2020**, *9*, 2365, doi:10.3390/cells9112365.
104. Ozawa, T.; Araki, N.; Yunoue, S.; Tokuo, H.; Feng, L.; Patrakitkomjorn, S.; Hara, T.; Ichikawa, Y.; Matsumoto, K.; Fujii, K.; et al. The Neurofibromatosis Type 1 Gene Product Neurofibromin Enhances Cell Motility by Regulating Actin Filament Dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-Cofilin Pathway. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 39524–39533, doi:10.1074/jbc.M503707200.
105. Petrilli, A.; Copik, A.; Posadas, M.; Chang, L.-S.; Welling, D.B.; Giovannini, M.; Fernández-Valle, C. LIM Domain Kinases as Potential Therapeutic Targets for Neurofibromatosis Type 2. *Oncogene* **2014**, *33*, 3571–3582, doi:10.1038/onc.2013.320.

106. Manetti, F. Recent Advances in the Rational Design and Development of LIM Kinase Inhibitors Are Not Enough to Enter Clinical Trials. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *155*, 445–458, doi:10.1016/j.ejmech.2018.06.016.
107. Acevedo, K.; Moussi, N.; Li, R.; Soo, P.; Bernard, O. LIM Kinase 2 Is Widely Expressed in All Tissues. *J Histochem Cytochem.* **2006**, *54*, 487–501, doi:10.1369/jhc.5C6813.2006.
108. Pröschel, C.; Blouin, M.J.; Gutowski, N.J.; Ludwig, R.; Noble, M. Limk1 Is Predominantly Expressed in Neural Tissues and Phosphorylates Serine, Threonine and Tyrosine Residues in Vitro. *Oncogene* **1995**, *11*, 1271–1281.
109. Po'uha, S.T.; Shum, M.S.Y.; Goebel, A.; Bernard, O.; Kavallaris, M. LIM-Kinase 2, a Regulator of Actin Dynamics, Is Involved in Mitotic Spindle Integrity and Sensitivity to Microtubule-Destabilizing Drugs. *Oncogene* **2010**, *29*, 597–607, doi:10.1038/onc.2009.367.
110. Sumi, T.; Matsumoto, K.; Shibuya, A.; Nakamura, T. Activation of LIM Kinases by Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinase α . *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 23092–23096, doi:10.1074/jbc.C100196200.
111. Tastet, J.; Cuberos, H.; Vallée, B.; Toutain, A.; Raynaud, M.; Marouillat, S.; Thépault, R.-A.; Laumonnier, F.; Bonnet-Brilhault, F.; Vourc'h, P.; et al. LIMK2-1 Is a Hominidae-Specific Isoform of LIMK2 Expressed in Central Nervous System and Associated with Intellectual Disability. *Neuroscience* **2019**, *399*, 199–210, doi:10.1016/j.neuroscience.2018.12.017.
112. Vallée, B.; Cuberos, H.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gosset, D.; Vourc'h, P.; Andres, C.R.; Bénédicti, H. LIMK2-1, a New Isoform of Human LIMK2, Regulates Actin Cytoskeleton Remodeling via a Different Signaling Pathway than That of Its Two Homologs, LIMK2a and LIMK2b. *Biochemical Journal* **2018**, *475*, 3745–3761, doi:10.1042/BCJ20170961.
113. Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Bénédicti, H. Characterization at the Molecular Level Using Robust Biochemical Approaches of a New Kinase Protein. *JoVE* **2019**, 59820, doi:10.3791/59820.
114. Osada, H.; Hasada, K.; Inazawa, J.; Uchida, K.; Ueda, R.; Takahashi, T.; Takahashi, T. Subcellular Localization and Protein Interaction of the Human LIMK2 Gene Expressing Alternative Transcripts with Tissue-Specific Regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, *229*, 582–589, doi:10.1006/bbrc.1996.1847.
115. Mizuno, K.; Okano, I.; Ohashi, K.; Nunoue, K.; Kuma, K.; Miyata, T.; Nakamura, T. Identification of a Human cDNA Encoding a Novel Protein Kinase with Two Repeats of the LIM/Double Zinc Finger Motif. *Oncogene* **1994**, *9*, 1605–1612.
116. Li, R.; Soosairajah, J.; Harari, D.; Citri, A.; Price, J.; Ng, H.L.; Morton, C.J.; Parker, M.W.; Yarden, Y.; Bernard, O.; et al. Hsp90 Increases LIM Kinase Activity by Promoting Its Homo-dimerization. *FASEB j.* **2006**, *20*, 1218–1220, doi:10.1096/fj.05-5258fje.
117. Johnson, E.O.; Chang, K.-H.; Ghosh, S.; Venkatesh, C.; Giger, K.; Low, P.S.; Shah, K. LIMK2 Is a Crucial Regulator and Effector of Aurora-A-Kinase-Mediated Malignancy. *Journal of Cell Science* **2012**, *125*, 1204–1216, doi:10.1242/jcs.092304.

118. Bernard, O. Lim Kinases, Regulators of Actin Dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, 39, 1071–1076, doi:10.1016/j.biocel.2006.11.011.
119. Irons, S.L.; Chambers, A.C.; Lissina, O.; King, L.A.; Possee, R.D. Protein Production Using the Baculovirus Expression System. *CP Protein Science* **2018**, 91, doi:10.1002/cpps.45.
120. Greenfield, N.J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat Protoc* **2006**, 1, 2876–2890, doi:10.1038/nprot.2006.202.
121. Stawikowski, M.; Fields, G.B. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* **2002**, CHAPTER, Unit-18.1, doi:10.1002/0471140864.ps1801s26.
122. Side Reactions in Peptide Synthesis: An Overview. *IJPRT* **2019**, 8, doi:10.31838/ijprt/08.01.01.
123. Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. Advances in Fmoc Solid-phase Peptide Synthesis. *J Pept Sci* **2016**, 22, 4–27, doi:10.1002/psc.2836.
124. Spears, R.J.; McMahon, C.; Chudasama, V. Cysteine Protecting Groups: Applications in Peptide and Protein Science. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 11098–11155, doi:10.1039/D1CS00271F.
125. Miles, A.J.; Janes, R.W.; Wallace, B.A. Tools and Methods for Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins: A Tutorial Review. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 8400–8413, doi:10.1039/D0CS00558D.
126. Brittain, H.G. ORD and Polarimetry Instruments*. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier, 1999; pp. 2024–2029 ISBN 978-0-12-374413-5.
127. Rogers, D.M.; Jasim, S.B.; Dyer, N.T.; Auvray, F.; Réfrégiers, M.; Hirst, J.D. Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. *Chem* **2019**, 5, 2751–2774, doi:10.1016/j.chempr.2019.07.008.
128. Woody, R.W. Circular Dichroism of Peptides. In *Conformation in Biology and Drug Design*; Elsevier, 1985; pp. 15–114 ISBN 978-0-12-304207-1.
129. Ranjbar, B.; Gill, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. *Chem Biol Drug Des* **2009**, 74, 101–120, doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x.
130. Ohashi, K.; Nagata, K.; Maekawa, M.; Ishizaki, T.; Narumiya, S.; Mizuno, K. Rho-Associated Kinase ROCK Activates LIM-Kinase 1 by Phosphorylation at Threonine 508 within the Activation Loop. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 3577–3582, doi:10.1074/jbc.275.5.3577.
131. Edwards, D.C.; Gill, G.N. Structural Features of LIM Kinase That Control Effects on the Actin Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 11352–11361, doi:10.1074/jbc.274.16.11352.
132. Hiraoka, J.; Okano, I.; Higuchi, O.; Yang, N.; Mizuno, K. Self-association of LIM-kinase 1 Mediated by the Interaction between an N-terminal LIM Domain and a C-terminal Kinase Domain. *FEBS Letters* **1996**, 399, 117–121, doi:10.1016/S0014-5793(96)01303-8.

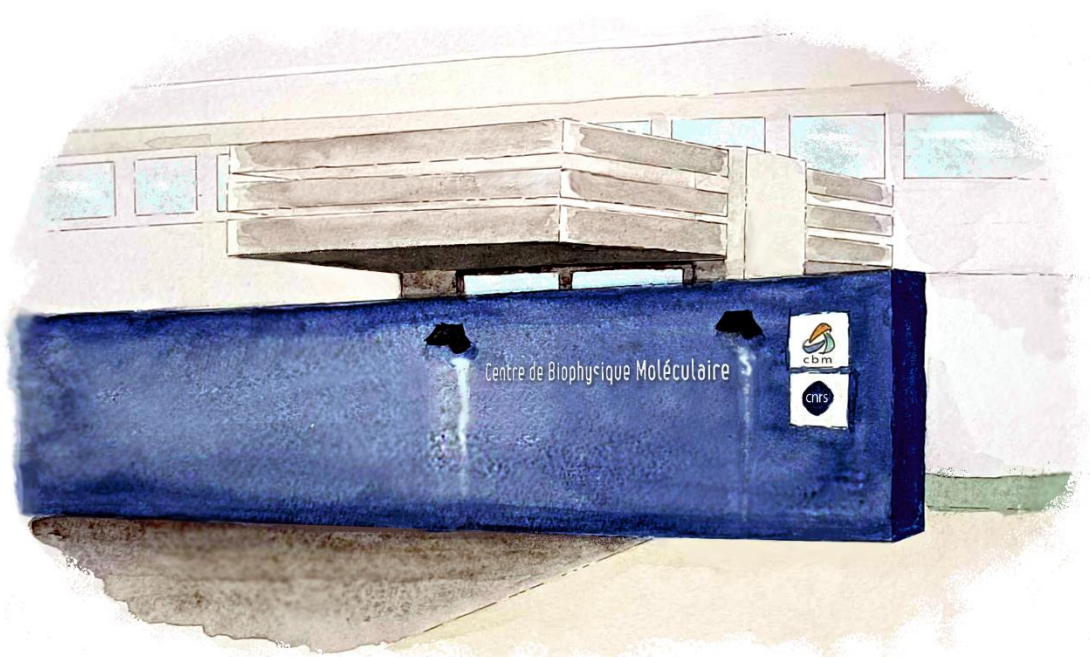
133. Nagata, K.; Ohashi, K.; Yang, N.; Mizuno, K. The N-Terminal LIM Domain Negatively Regulates the Kinase Activity of LIM-Kinase 1. *Biochem J* **1999**, *343 Pt 1*, 99–105.
134. Casanova-Sepúlveda, G.; Sexton, J.A.; Turk, B.E.; Boggon, T.J. Autoregulation of the LIM Kinases by Their PDZ Domain. *Nat Commun* **2023**, *14*, 1–13, doi:10.1038/s41467-023-44148-4.
135. Chetty, A.K.; Sexton, J.A.; Ha, B.H.; Turk, B.E.; Boggon, T.J. Recognition of Physiological Phosphorylation Sites by P21-Activated Kinase 4. *Journal of Structural Biology* **2020**, *211*, 107553, doi:10.1016/j.jsb.2020.107553.
136. Dong, Q.; Ji, Y.-S.; Cai, C.; Chen, Z.-Y. LIM Kinase 1 (LIMK1) Interacts with Tropomyosin-Related Kinase B (TrkB) and Mediates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)-Induced Axonal Elongation. **2012**, *287*, 12.
137. Nikhil, K.; Haymour, H.S.; Kamra, M.; Shah, K. Phosphorylation-Dependent Regulation of SPOP by LIMK2 Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer. *Br J Cancer* **2021**, *124*, 995–1008, doi:10.1038/s41416-020-01197-6.
138. Bowen, C.; Ostrowski, M.C.; Leone, G.; Gelmann, E.P. Loss of PTEN Accelerates NKX3.1 Degradation to Promote Prostate Cancer Progression. *Cancer Res* **2019**, *79*, 4124–4134, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-4110.
139. Valle-Mendiola, A.; Bustos-Rodríguez, R.; Domínguez-Melendez, V.; Zerecero-Carreón, O.; Gutiérrez-Hoya, A.; Weiss-Steider, B.; Soto-cruz, I. Mutations in the Helix α C of the Catalytic Domain from the EGFR Affect Its Activity in Cervical Cancer Cell Lines. *Oncol Lett* **2022**, *23*, 71, doi:10.3892/ol.2022.13191.
140. Nguyen, D.; Lin, L.Y.; Zhou, J.O.; Kibby, E.; Sia, T.W.; Tillis, T.D.; Vapuryan, N.; Xu, M.-R.; Potluri, R.; Shin, Y.; et al. Identification and Characterization of a B-Raf Kinase α -Helix Critical for the Activity of MEK Kinase in MAPK Signaling. *Biochemistry* **2020**, *59*, 4755–4765, doi:10.1021/acs.biochem.0c00598.
141. Tanford, Charles. **Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation of Proteins.** *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 4240–4247, doi:10.1021/ja00881a009.
142. Kathuria, S.V.; Chan, Y.H.; Nobrega, R.P.; Özen, A.; Matthews, C.R. Clusters of Isoleucine, Leucine, and Valine Side Chains Define Cores of Stability in High-energy States of Globular Proteins: Sequence Determinants of Structure and Stability. *Protein Science* **2016**, *25*, 662–675, doi:10.1002/pro.2860.
143. Xin, F.; Radivojac, P. Post-Translational Modifications Induce Significant yet Not Extreme Changes to Protein Structure. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2905–2913, doi:10.1093/bioinformatics/bts541.
144. Nishi, H.; Shaytan, A.; Panchenko, A.R. Physicochemical Mechanisms of Protein Regulation by Phosphorylation. *Front. Genet.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fgene.2014.00270.
145. Jamal, S.; Ali, W.; Nagpal, P.; Grover, A.; Grover, S. Predicting Phosphorylation Sites Using Machine Learning by Integrating the Sequence, Structure, and Functional Information of Proteins. *Journal of Translational Medicine* **2021**, *19*, 218, doi:10.1186/s12967-021-02851-0.

146. Chen, M.; Zhang, W.; Gou, Y.; Xu, D.; Wei, Y.; Liu, D.; Han, C.; Huang, X.; Li, C.; Ning, W.; et al. GPS 6.0: An Updated Server for Prediction of Kinase-Specific Phosphorylation Sites in Proteins. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51*, W243–W250, doi:10.1093/nar/gkad383.
147. Biswas, A.K.; Noman, N.; Sikder, A.R. Machine Learning Approach to Predict Protein Phosphorylation Sites by Incorporating Evolutionary Information. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 273, doi:10.1186/1471-2105-11-273.
148. Lau, Y.H.; De Andrade, P.; Wu, Y.; Spring, D.R. Peptide Stapling Techniques Based on Different Macrocyclisation Chemistries. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 91–102, doi:10.1039/C4CS00246F.
149. De Araujo, A.D.; Lim, J.; Wu, K.-C.; Hoang, H.N.; Nguyen, H.T.; Fairlie, D.P. Landscaping Macrocyclic Peptides: Stapling hDM2-Binding Peptides for Helicity, Protein Affinity, Proteolytic Stability and Cell Uptake. *RSC Chem. Biol.* **2022**, *3*, 895–904, doi:10.1039/D1CB00231G.
150. Skowron, K.J.; Speltz, T.E.; Moore, T.W. Recent Structural Advances in Constrained Helical Peptides. *Med Res Rev* **2019**, *39*, 749–770, doi:10.1002/med.21540.
151. Moiola, M.; Memeo, M.G.; Quadrelli, P. Stapled Peptides—A Useful Improvement for Peptide-Based Drugs. *Molecules* **2019**, *24*, 3654, doi:10.3390/molecules24203654.
152. Crone, N.S.A.; Kros, A.; Boyle, A.L. Modulation of Coiled-Coil Binding Strength and Fusogenicity through Peptide Stapling. *Bioconjug Chem* **2020**, *31*, 834–843, doi:10.1021/acs.bioconjchem.0c00009.
153. Baek, S.; Kutchukian, P.S.; Verdine, G.L.; Huber, R.; Holak, T.A.; Lee, K.W.; Popowicz, G.M. Structure of the Stapled P53 Peptide Bound to Mdm2. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 103–106, doi:10.1021/ja2090367.
154. Lyu, P.C.; Sherman, J.C.; Chen, A.; Kallenbach, N.R. Alpha-Helix Stabilization by Natural and Unnatural Amino Acids with Alkyl Side Chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 5317–5320.
155. Bird, G.H.; Madani, N.; Perry, A.F.; Princiotto, A.M.; Supko, J.G.; He, X.; Gavathiotis, E.; Sodroski, J.G.; Walensky, L.D. Hydrocarbon Double-Stapling Remedies the Proteolytic Instability of a Lengthy Peptide Therapeutic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14093–14098, doi:10.1073/pnas.1002713107.
156. Dougherty, P.G.; Wen, J.; Pan, X.; Koley, A.; Ren, J.-G.; Sahni, A.; Basu, R.; Salim, H.; Appiah Kubi, G.; Qian, Z.; et al. Enhancing the Cell-Permeability of Stapled Peptides with a Cyclic Cell-Penetrating Peptide. *J Med Chem* **2019**, *62*, 10098–10107, doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00456.
157. Ludwig, C.; Akad, S.B. *Wiss. Wien* **1856**, *20*, 539.
158. Soret, C. Sur l'état d'équilibre Que Prend, Au Point de Vue de Sa Concentration, Une Dissolution Saline Primitivement Homogène, Dont Deux Parties Sont Portées à Des Températures Différentes; Archives de Genève, 3e Periode, t. II, p. 48; 1879. *J. Phys. Theor. Appl.* **1879**, *9*, 331–332, doi:10.1051/jphystap:018800090033101.
159. Braun, D.; Libchaber, A. Trapping of DNA by Thermophoretic Depletion and Convection. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 188103, doi:10.1103/PhysRevLett.89.188103.

160. Iacopini, S.; Piazza, R. Thermophoresis in Protein Solutions. *Europhys. Lett.* **2003**, *63*, 247–253, doi:10.1209/epl/i2003-00520-y.
161. Seidel, S.A.I.; Dijkman, P.M.; Lea, W.A.; van den Bogaart, G.; Jerabek-Willemsen, M.; Lazic, A.; Joseph, J.S.; Srinivasan, P.; Baaske, P.; Simeonov, A.; et al. Microscale Thermophoresis Quantifies Biomolecular Interactions under Previously Challenging Conditions. *Methods* **2013**, *59*, 301–315, doi:10.1016/j.ymeth.2012.12.005.
162. Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C.J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *ASSAY and Drug Development Technologies* **2011**, *9*, 342–353, doi:10.1089/adt.2011.0380.
163. Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H.M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction Analysis and Beyond. *Journal of Molecular Structure* **2014**, *1077*, 101–113, doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009.
164. Asmari, M.; Ratih, R.; Alhazmi, H.A.; El Deeb, S. Thermophoresis for Characterizing Biomolecular Interaction. *Methods* **2018**, *146*, 107–119, doi:10.1016/j.ymeth.2018.02.003.
165. Rainard, J.M.; Pandarakalam, G.C.; McElroy, S.P. Using Microscale Thermophoresis to Characterize Hits from High-Throughput Screening: A European Lead Factory Perspective. *SLAS Discovery* **2018**, *23*, 225–241, doi:10.1177/2472555217744728.
166. Zhou, M.; Li, Q.; Wang, R. Current Experimental Methods for Characterizing Protein-Protein Interactions. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 738–756, doi:10.1002/cmdc.201500495.
167. Wienken, C.J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D.; Duhr, S. Protein-Binding Assays in Biological Liquids Using Microscale Thermophoresis. *Nat Commun* **2010**, *1*, 100, doi:10.1038/ncomms1093.
168. Magnez, R.; Thiroux, B.; Tardy, M.; Quesnel, B.; Thuru, X. Measurement of Protein-Protein Interactions through Microscale Thermophoresis (MST). *BIO-PROTOCOL* **2020**, *10*, doi:10.21769/BioProtoc.3574.
169. Magnez, R.; Bailly, C.; Thuru, X. Microscale Thermophoresis as a Tool to Study Protein Interactions and Their Implication in Human Diseases. *IJMS* **2022**, *23*, 7672, doi:10.3390/ijms23147672.
170. El Deeb, S.; Al-Harrasi, A.; Khan, A.; Al-Broumi, M.; Al-Thani, G.; Alomairi, M.; Elumalai, P.; Sayed, R.A.; Ibrahim, A.E. Microscale Thermophoresis as a Powerful Growing Analytical Technique for the Investigation of Biomolecular Interaction and the Determination of Binding Parameters. *Methods Appl. Fluoresc.* **2022**, *10*, 042001, doi:10.1088/2050-6120/ac82a6.
171. Holdgate, G.; Embrey, K.; Milbradt, A.; Davies, G. Biophysical Methods in Early Drug Discovery. *ADMET DMPK* **2019**, *7*, 222–241, doi:10.5599/admet.733.
172. Arbel, N.; Ben-Hail, D.; Shoshan-Barmatz, V. Mediation of the Antiapoptotic Activity of Bcl-xL Protein upon Interaction with VDAC1 Protein. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 23152–23161, doi:10.1074/jbc.M112.345918.

173. Lei, Q.; Wang, D.; Sun, K.; Wang, L.; Zhang, Y. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 672, doi:10.3389/fcell.2020.00672.
174. Magnez, R.; Thiroux, B.; Taront, S.; Segaula, Z.; Quesnel, B.; Thuru, X. PD-1/PD-L1 Binding Studies Using Microscale Thermophoresis. *Sci Rep* **2017**, *7*, 17623, doi:10.1038/s41598-017-17963-1.
175. Cheng, X.; Veverka, V.; Radhakrishnan, A.; Waters, L.C.; Muskett, F.W.; Morgan, S.H.; Huo, J.; Yu, C.; Evans, E.J.; Leslie, A.J.; et al. Structure and Interactions of the Human Programmed Cell Death 1 Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 11771–11785, doi:10.1074/jbc.M112.448126.
176. Giubellino, A.; Burke, T.R.; Bottaro, D.P. Grb2 Signaling in Cell Motility and Cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2008**, *12*, 1021–1033, doi:10.1517/14728222.12.8.1021.
177. Lin, C.-C.; Melo, F.A.; Ghosh, R.; Suen, K.M.; Stagg, L.J.; Kirkpatrick, J.; Arold, S.T.; Ahmed, Z.; Ladbury, J.E. Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2. *Cell* **2012**, *149*, 1514–1524, doi:10.1016/j.cell.2012.04.033.
178. Bartoschik, T.; Zoephel, A.; Rumpel, K.; Ciulli, A.; Heffern, C. MST and TRIC Technology to Reliably Study PROTAC Binary and Ternary Binding in Drug Development. In *Targeted Protein Degradation*; Cacace, A.M., Hickey, C.M., Békés, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2021; Vol. 2365, pp. 115–133 ISBN 978-1-07-161664-2.
179. Linke, P.; Amaning, K.; Maschberger, M.; Vallee, F.; Steier, V.; Baaske, P.; Duhr, S.; Breitsprecher, D.; Rak, A. An Automated Microscale Thermophoresis Screening Approach for Fragment-Based Lead Discovery. *SLAS Discovery* **2016**, *21*, 414–421, doi:10.1177/1087057115618347.
180. Etienne-Manneville, S.; Hall, A. Rho GTPases in Cell Biology. *Nature* **2002**, *420*, 629–635, doi:10.1038/nature01148.
181. Shang, X.; Marchioni, F.; Evelyn, C.R.; Sipes, N.; Zhou, X.; Seibel, W.; Wortman, M.; Zheng, Y. Small-Molecule Inhibitors Targeting G-Protein–Coupled Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 3155–3160, doi:10.1073/pnas.1212324110.
182. Cozzolino, F.; Iacobucci, I.; Monaco, V.; Monti, M. Protein–DNA/RNA Interactions: An Overview of Investigation Methods in the -Omics Era. *J. Proteome Res.* **2021**, *20*, 3018–3030, doi:10.1021/acs.jproteome.1c00074.
183. Moon, M.H.; Hilimire, T.A.; Sanders, A.M.; Schneekloth, J.S. Measuring RNA–Ligand Interactions with Microscale Thermophoresis. *Biochemistry* **2018**, *57*, 4638–4643, doi:10.1021/acs.biochem.7b01141.
184. Corbeski, I.; Horn, V.; Van Der Valk, R.A.; Le Paige, U.B.; Dame, R.T.; Van Ingen, H. Microscale Thermophoresis Analysis of Chromatin Interactions. In *Bacterial Chromatin*; Dame, R.T., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1837, pp. 177–197 ISBN 978-1-4939-8674-3.
185. Pauli, A.; Rinn, J.L.; Schier, A.F. Non-Coding RNAs as Regulators of Embryogenesis. *Nat Rev Genet* **2011**, *12*, 136–149, doi:10.1038/nrg2904.

186. Jacob, D.; Thüring, K.; Galliot, A.; Marchand, V.; Galvanin, A.; Ciftci, A.; Scharmann, K.; Stock, M.; Roignant, J.; Leidel, S.A.; et al. Absolute Quantification of Noncoding RNA by Microscale Thermophoresis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 9565–9569, doi:10.1002/anie.201814377.
187. Matlashov, M.E.; Shcherbakova, D.M.; Alvelid, J.; Baloban, M.; Pennacchietti, F.; Shemetov, A.A.; Testa, I.; Verkhusha, V.V. A Set of Monomeric Near-Infrared Fluorescent Proteins for Multicolor Imaging across Scales. *Nat Commun* **2020**, *11*, 239, doi:10.1038/s41467-019-13897-6.
188. Shcherbakova, D.M.; Verkhusha, V.V. Near-Infrared Fluorescent Proteins for Multicolor in Vivo Imaging. *Nat Methods* **2013**, *10*, 751–754, doi:10.1038/nmeth.2521.
189. Bartoschik, T.; Galinec, S.; Kleusch, C.; Walkiewicz, K.; Breitsprecher, D.; Weigert, S.; Muller, Y.A.; You, C.; Piehler, J.; Vercruysse, T.; et al. Near-Native, Site-Specific and Purification-Free Protein Labeling for Quantitative Protein Interaction Analysis by MicroScale Thermophoresis. *Sci Rep* **2018**, *8*, 4977, doi:10.1038/s41598-018-23154-3.



Etudes moléculaires des LIM kinases, LIMK1 et LIMK2, protéines impliquées dans le remaniement du cytosquelette : mise en évidence d'un nouveau mécanisme de régulation et développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

Les LIM kinases, LIMK1 et LIMK2, sont des sérines/thréonine et tyrosines kinases capables de phosphoryler et d'inactiver la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine. Elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes moléculaires indispensables à la vie de la cellule de par leur rôle crucial dans la dynamique du cytosquelette. Lorsqu'elles sont dérégulées, elles peuvent participer à l'apparition de pathologies, comme les cancers, certaines maladies neurologiques ou encore les neurofibromatoses. Les LIM kinases sont donc des cibles thérapeutiques intéressantes, et constituent une alternative aux thérapies classiques anticancéreuses et une opportunité pour les pathologies pour lesquelles il n'existe actuellement pas de thérapie. À ce jour, cependant, aucune molécule inhibitrice des LIM kinases n'est parvenue à passer le stade des essais cliniques en vue d'une mise sur le marché. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les processus moléculaires qui régulent l'activité de ces protéines, en particulier sur la cofiline, pour espérer mettre à jour de nouvelles thérapies ciblées, sélectives et efficaces. Les études menées au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation de l'activité des LIM kinases sur la cofiline, impliquant un acide aminé de l'extrémité C-terminale : la tyrosine 630. Ce résidu est impliqué dans la dimérisation et la transphosphorylation des LIMKs, des processus indispensables à leur activation en permettant leur phosphorylation sur la thréonine 505 et leur activité sur la cofiline. En parallèle, j'ai aussi contribué à faire la preuve de concept de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les LIMKs : des *stapled peptides* inhibant de façon spécifique l'interaction entre les LIMKs et la cofiline. Ces résultats, très prometteurs, pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les LIM kinases, jusque-là considérées comme des impasses thérapeutiques, plus efficaces car plus spécifiques et sélectives, avec des effets secondaires limités. L'ensemble des études que j'ai réalisées au cours de ma thèse permet une meilleure compréhension des LIMKs à l'échelle moléculaire, ce qui ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques visant ces kinases.

Mots clés : LIM kinases, cytosquelette, voie de signalisation, neurofibromatose, cancer, cibles thérapeutiques...

Molecular studies of the LIM kinases, LIMK1 and LIMK2, involved in cytoskeleton remodelling: new insights into their regulation and development of original therapeutic strategies

LIM kinases, LIMK1 and LIMK2, are serine/threonine and tyrosine kinases phosphorylating and inactivating cofilin, an actin depolymerization factor. They are involved in numerous molecular mechanisms essential to cell life due to their crucial role in cytoskeleton dynamics. When dysregulated, they can contribute to the development of pathologies, such as cancers, certain neurological diseases or neurofibromatosis. LIM kinases are therefore interesting therapeutic targets, as they constitute an alternative to traditional anticancer therapies and an opportunity for pathologies for which there is currently no therapy. However, no LIM kinase inhibitor molecule has managed to pass clinical trials in order to get marketing authorization. It is therefore necessary to have a better understanding of the molecular processes that regulate the activity of these proteins, particularly on cofilin, in order to develop innovative, selective and effective therapies. The studies performed during my thesis have highlighted a new mechanism of regulation of the activity of LIM kinases on cofilin, involving an amino acid at the C-terminal end: tyrosine 630. This residue is involved in the dimerization and transphosphorylation of LIMKs, processes that are crucial for their activation, allowing their phosphorylation on threonine 505 and their activity on cofilin. At the same time, I also contributed to the proof of concept of a new therapeutic approach targeting LIMKs: stapled peptides specifically inhibiting the interaction between LIMKs and cofilin. These very promising results open the path to the development of new therapeutic strategies targeting LIM kinases, hitherto considered as undruggable, more effective because they are more specific and selective, with limited side effects. All of the studies that I carried out during my thesis allow a better understanding of LIMKs at the molecular level, which opens the way to new therapeutic approaches targeting these kinases.

Keywords : LIM kinases, cytoskeleton, cell signalling, neurofibromatosis, cancer, therapeutical targets...



Centre de Biophysique Moléculaire

Rue Charles Sadron
45100 Orléans

