

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

CNRS UPR4301 Equipe « Signalisation cellulaire et Neurofibromatose »

INSERM U930 Equipe « Neurogénétique et neurométabolomique »

THÈSE présentée par :

Hélène CUBEROS

soutenue le : 21 juin 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Les LIM kinases dans la neurofibromatose de type 1 : Caractérisation cellulaire et moléculaire de LIMK2-1, une isoforme associée à la déficience intellectuelle

THÈSE dirigée par :

M. ANDRES Christian

PU-PH, Université François-Rabelais, Tours

Mme BENEDETTI Hélène

DR CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans

RAPPORTEURS :

Mme ANDRIEUX Annie

DR CEA, Institut des Neurosciences, Grenoble

Mme LAFANECHERE Laurence

DR CNRS, Institut Albert Bonniot, Grenoble

JURY :

M. ANDRES Christian

PU-PH, Université François-Rabelais, Tours

Mme ANDRIEUX Annie

DR CEA, Institut des Neurosciences, Grenoble

Mme BENEDETTI Hélène

DR CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans

Mme LAFANECHERE Laurence

DR CNRS, Institut Albert Bonniot, Grenoble

M. STURTZ Franck

PU-PH, Université de Limoges

M. VOUREC'H Patrick

PU-PH, Université François-Rabelais, Tours

"We live on an island surrounded by a sea of ignorance. As our island of knowledge grows, so does the shore of our ignorance." (John A. Wheeler)

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci au docteur **Annie Andrieux**, de l'Institut des neurosciences de Grenoble, et au docteur **Laurence Lafanechère**, de l'Institut Albert Bonniot de Grenoble, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Je remercie également le professeur **Franck Sturtz**, de l'université de Limoges, et le professeur **Patrick Vourc'h**, de l'université de Tours, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au professeur **Denis Guilloteau**, directeur de l'unité INSERM U930, et au docteur **Eva Jakab-Toth**, directrice du Centre de biophysique moléculaire pour m'avoir accueillie dans leurs unités respectives.

Je remercie mes deux directeurs de thèse pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail, ainsi que pour leur confiance et la grande autonomie qu'ils m'ont accordée. Merci au professeur **Christian Andres** pour ses nombreux conseils qui m'ont permis d'analyser mes résultats et m'ont souvent aidée à remettre mon travail en perspective, ainsi que pour ses relectures attentives. Merci au docteur **Hélène Bénédicti** pour sa disponibilité lors de ma plongée dans les manips orléanaises et lors de mes divers travaux de rédactions, pour ses encouragements et ses conseils qui m'ont beaucoup aidée à avancer.

Un grand merci au docteur **Béatrice Vallée**, avec qui j'ai partagé cette thématique passionnante (et parfois déroutante !) qu'est l'étude des LIM kinases. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et tes nombreux conseils. Merci également pour avoir supporté avec moi les manips en radioactivité par 30°C l'été. Ce n'était pas évident, mais les résultats en valaient la peine.

Merci également au docteur **Frédéric Laumonier** pour nos échanges formateurs et ses réponses à mes nombreuses questions sur la culture cellulaire. La culture des SH-SY5Y n'a (presque) plus de secrets pour moi désormais...

Merci aux filles, au docteur **Sylviane Marouillat**, à **Rose-Anne Thépault** et **Cathy Antar**, vous êtes l'âme de ce laboratoire. Merci pour votre disponibilité et votre écoute, votre

bonne humeur et pour toutes ces heures passées à rire et à refaire le monde, pendant les pauses café et les pauses repas.

Merci encore au professeur **Patrick Vourc'h**, de toujours trouver quelques minutes, dans un emploi du temps pourtant surchargé, pour répondre aux questions ou donner un avis éclairant et éclairé.

Merci aux docteurs **Patrick Emond** et **Sylvie Mavel**, pour leur bonne humeur.

Un immense merci à mes co-bureaux tourangeaux. Je commencerai par les ancien(nes) : merci à **Audrey** et à **Charlotte**, pour m'avoir appris les bases de la culture cellulaire. Merci **Binta**, pour ta bonne humeur communicative et pour avoir *presque* réussi à m'intéresser à la métabolomique, **François**, pour tes blagues, à peu près aussi mauvaises que les miennes et **Julie**, pour avoir ouvert la voie des LIM kinases et considérablement débroussaillé le sujet.

Merci également à mes co-bureaux actuels. Merci **Servane** pour ta gentillesse, pour nos fous rires, nos « soirées guimauves », mais aussi pour nos après-midi jeux, nos restos et nos vacances avec Romain et Patrick. Pourvu qu'il y en ait encore pendant des années ! Et le mot de la fin sera « kiwiboo ». Merci également **Blandine**, pour nos petites pauses thés de l'après-midi, à papoter et papoter encore. Tu es la prochaine, ça va passer vite tu verras ! Merci aussi **Devina**, pour ta disponibilité et tes histoires d'étudiants qui me font toujours rire, **Cindy**, pour ton enthousiasme et tes expressions qui me rappellent le sud, à **Tania**, pour ta gentillesse et tes encouragements, et à **Franck**, perdu au milieu des filles du bureau. Enfin, merci à tous pour l'animation et la bonne humeur que vous apportez au labo.

J'aimais également remercier ma co-bureau orléanaise, **Fabienne**. Ce fut un plaisir de partager ce bureau avec toi. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Merci à l'équipe pédagogique, à commencer par **Anne-So**. Enseigner avec Blandine et toi a été une expérience exceptionnelle. Merci pour nos fous-rires à parler de nos expériences d'enseignement, de pichets d'eau et de poneys. Je remercie également le professeur **Frédéric Esnard**, les docteurs **Lydie Nadal-Desbarat**, **Sandrine Dallet-Choisy** et tous les autres, pour leur aide et leurs conseils. Merci aussi à **Anne Brouard**, pour sa disponibilité et ses réponses à mes (nombreuses) questions.

Je voudrais remercier le docteur **Sophie Fouchecourt**, pour nos échanges passionnants en éthique et vos conseils de lectures, qui m'ont beaucoup fait réfléchir.

Merci aux stagiaires que j'ai croisée, la petite **Hélène, Alexandre, Dalya, Isa, Lauren, Manon, Paul, Pierre, Roxane, Sylvia**, et ceux que j'oublie sûrement. Merci aussi à tous les autres, tous ceux que j'ai croisé au cours de ma thèse : **Antoine, Cinzia, Jean-Michel**, pour nos papotages pendant les pauses et, surtout, pour votre bonne humeur.

J'aimerais remercier mes amis, de Tours et d'ailleurs :

A **Alexandre, Marion, Sophie** et **Léo**, merci à tous les quatre pour nos weekends jeux, films, balades et papotages, à Tours, à Marseille ou à Paris. Vivement le prochain !

A **Flo**, l'incorrigible troll, pour tous ces bons moments passés sur Tours, autour d'un verre, d'un jeu et/ou d'un barbecue.

A **Patrick**, pour tout ce que j'ai cité plus haut, attention quand même aux discussions sur les jeux vidéos ! Et aux canards...

A **Nathalie**, pour nos appels, qui parfois peuvent durer des heures, à parler génétique, biologie et tout un tas d'autres choses passionnantes. Merci aussi pour toutes nos soirées marseillaises, pizzas ou bruschettas et séries télé.

A **Cécile**, pour nos longues discussions et nos RP, même s'ils sont à l'abandon depuis longtemps. J'espère avoir bientôt l'occasion de vous voir, toi, ton affreux et tes adorables petits monstres.

A **Olivia**, pour tout ce que nous avons traversé depuis le collège, pour nos fous rires et nos coups de gueule, et pour nos délires, à tire d'aile.

A **Adé** et **PA**, même si je ne comprends pas toujours tout de vos élucubrations médico-psychiatriques, nos soirées autour d'un verre, d'un restau ou d'un jeu de rôle (à quand le prochain !) sont toujours de très bons moments.

Je remercie également ma « **belle-famille** » pour m'avoir accueillie à bras ouverts, pour tous ces vendredis soirs (et quelques dimanches midi), riches en discussions et débats, souvent animés, toujours intéressants. Un merci particulier à **Aude**, également future collègue, pour tous ses conseils sur le métier que je m'appête à choisir.

Un grand merci à ma **famille**, pour avoir été là depuis le début. Je ne pourrai pas citer tout le monde, la liste serait trop longue, mais j'ai une pensée pour chacun d'entre vous.

A mon oncle **Norbert** et ma tante **Michèle**, pour tous ces étés extraordinaires et pour avoir été là lors de mes deux ans marseillais.

A mes **grands-parents**, pour avoir été présents pour tant de moments importants. A ma mamie **Flavie**, à qui j'aurais aimé raconter ces derniers mois. A mon papy **Paul** et ma mémé **Thérèse**, pour nos coups de téléphone à raconter ces petits bouts de rien qui font tout.

Un immense merci à mes **parents**. Je n'aurais jamais pu aller si loin sans vous. Chaque jour, je réalise la chance que j'ai d'être votre fille. Merci de m'avoir soutenue dans mes choix, de m'avoir appris à garder l'esprit ouvert, merci pour tout l'amour que vous me portez. Merci aussi à mes frères, pour leur soutien et leur présence. **Christophe**, tu as eu un impact décisif sur mes choix d'études et, sans doute sur de nombreux aspects de mon caractère. Je pense que je peux te remercier pour ça, même si ça n'a pas toujours été simple pour toi. Merci aussi à mon petit frère **Matthieu**, pour avoir été là et parce que je sais que tu seras toujours présent pour chacun d'entre nous. Vous êtes exceptionnels tous les deux, ne l'oubliez jamais.

Pour finir, merci à mon homme, mon **Romain**, pour être là au quotidien, pour ton soutien, mais aussi pour avoir bouleversé mes perspectives, pour nos projets qui me donnent envie d'avancer avec toi, et pour tout le reste.

Résumé

LIMK1 et LIMK2 sont des sérines/thréonine kinases capables de phosphoryler et d'inactiver la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine. Elles sont régulées négativement par la neurofibromine, responsable de la neurofibromatose de type 1, et pourraient être impliquées à la fois dans les aspects tumoraux et cognitifs de cette maladie par leur rôle dans la dynamique de l'actine.

Nous avons étudié l'isoforme LIMK2-1 de LIMK2, spécifique des hominidés et précédemment associée à la déficience intellectuelle. Cette isoforme possède un domaine kinase tronqué et un domaine inhibiteur de la phosphatase 1 (PP1i) en C-terminal.

Nos résultats montrent, d'une part, que LIMK2-1 existe sous forme de protéine et qu'elle est exprimée dans le système nerveux central chez l'homme, en particulier au cours du neurodéveloppement. D'autre part, il apparaît que cette isoforme favorise la polymérisation de l'actine. Cette action semble indépendante de l'activité kinase puisque LIMK2-1 ne phosphoryle pas la cofiline. Nous avons également montré que le domaine PP1i interagissait spécifiquement avec la phosphatase 1 et des résultats complémentaires suggèrent un rôle de ce domaine dans l'inhibition de la dépolymérisation de l'actine.

Ces données mettent en évidence un mécanisme moléculaire nouveau pour une protéine de la famille des LIMK et soulignent l'intérêt d'étudier ces protéines afin de mieux comprendre leur implication dans les troubles cognitifs et dans la neurofibromatose de type 1.

Mots clés : Neurofibromatose de type 1, déficience intellectuelle, LIMK2, LIMK2-1, cofiline, actine

Abstract

LIMK1 and LIMK2 are serine/threonine kinases that phosphorylate and subsequently inactivate cofilin, an actin-depolymerizing factor. Neurofibromin, the protein responsible for neurofibromatosis type 1, negatively regulates these proteins that may be involved in tumoral and cognitive aspects of the disease through their role in actin dynamics.

We studied LIMK2-1, a hominidae-specific isoform previously involved in intellectual disability. This isoform possesses a truncated kinase domain and a protein phosphatase 1 inhibitory (PP1i) domain at its C-terminal extremity.

Our results showed that LIMK2-1 exists at a protein level and that it is expressed in human central nervous system, especially during neurodevelopment. Moreover, LIMK2-1 promotes actin polymerization independently from a kinase activity, since this isoform does not phosphorylate cofilin. We also highlighted an interaction between the PP1i domain and protein phosphatase 1 and complementary results suggest a role of this domain in the inhibition of actin depolymerization.

These data highlight a new molecular mechanism for a LIMK protein and emphasize the interest of studying these proteins to understand their involvement in cognitive disorders and in neurofibromatosis type 1.

Keywords: Neurofibromatosis type 1, intellectual disability, LIMK2-1, cofilin, actin

Table des matières

RESUME	9
ABSTRACT	11
LISTE DES TABLEAUX.....	17
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES ABRÉVIATIONS	23
INTRODUCTION.....	27
I. LA NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 1	30
<i>I.1. Historique.....</i>	<i>30</i>
<i>I.2. Epidémiologie.....</i>	<i>31</i>
<i>I.3. Clinique.....</i>	<i>31</i>
I.3.1. Principaux signes cliniques	31
I.3.2. Profils cognitifs et troubles associés.....	36
I.3.3. Facteurs d'hétérogénéité clinique	42
<i>I.4. Aspects génétiques.....</i>	<i>44</i>
I.4.1. Description du gène.....	44
I.4.2. Mutations du gène <i>NF1</i>	44
I.4.3. Corrélation génotype/phénotype	46
<i>I.5. La neurofibromine</i>	<i>48</i>
I.5.1. Expression de la protéine.....	48
I.5.2. Structure de la protéine	49
I.5.3. Régulation de la protéine	56
<i>I.6. Physiopathologie.....</i>	<i>57</i>
I.6.1. Rôle de <i>NF1</i> dans la tumorigenèse	57
I.6.2. Rôle de <i>NF1</i> dans les troubles cognitifs.....	59
II. LES LIM KINASES	64
<i>II.1. Aspects génétiques.....</i>	<i>64</i>
II.1.1. Organisation génomique	64
II.1.2. Isoformes	64
<i>II.2. Expression des LIM kinases.....</i>	<i>66</i>
<i>II.3. Les LIM kinases</i>	<i>68</i>

II.3.1. Structure des protéines.....	68
II.3.2. Régulation des protéines.....	69
II.3.3. Substrats des LIM kinases.....	78
II.4. <i>Physiopathologie</i>	86
II.4.1. Rôle des LIM kinases dans la tumorigenèse.....	86
II.4.2. Rôle des LIM kinases dans les fonctions et dysfonctions du système nerveux.....	92
OBJECTIFS.....	107
MATERIELS ET METHODES.....	111
I. ETUDE D'EXPRESSION.....	113
I.1. <i>Validation de l'anticorps anti-PP1i</i>	113
I.1.1. Culture cellulaire.....	113
I.1.2. Transfection au phosphate de calcium.....	113
I.1.3. Lyse des cellules et dosage des protéines.....	113
I.1.4. Western blot.....	114
I.2. <i>Expression de LIMK2-1 dans le système nerveux central</i>	115
I.2.1. Echantillons.....	115
I.2.2. Expression des ADNc.....	115
I.2.3. Expression des protéines.....	116
II. ETUDE MOLECULAIRE.....	117
II.1. <i>Productions des plasmides</i>	117
II.1.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	118
II.1.2. Mutagenèse dirigée.....	119
II.1.3. Clonage.....	120
II.1.4. Séquençage.....	121
II.2. <i>Etude de la polymérisation de l'actine</i>	121
II.2.1. Culture cellulaire.....	121
II.2.2. Transfection à la lipofectamine.....	122
II.2.3. Immunocytochimie.....	122
II.3. <i>Etude de la phosphorylation de la cofiline</i>	123
II.3.1. Mesure de l'activité kinase <i>in vitro</i>	123
II.3.2. Western blot.....	124
II.4. <i>Etude d'interaction entre la phosphatase 1 et LIMK2-1</i>	124
II.4.1. Co-immunoprécipitation.....	125
II.4.2. Western blot.....	125
II.5. <i>Etude de l'activité du domaine inhibiteur de la phosphatase 1</i>	126

II.5.1. Purification de la cofiline phosphorylée	126
III. ETUDE FONCTIONNELLE	128
III.1. Culture cellulaire et différenciation.....	128
III.2. Analyse de la différenciation des cellules.....	129
III.2.1. Extraction des ARN	129
III.2.2. RT-PCR.....	129
IV. ANALYSE BIO-INFORMATIQUE.....	130
IV.1. Recherche du domaine PP1i de LIMK2 chez les primates.....	130
IV.2. Logiciels d'évaluation des conséquences fonctionnelles de mutations.....	131
RESULTATS	133
I. ETUDE D'EXPRESSION DE LIMK2-1	135
I.1. Une isoforme spécifique des hominidés	135
I.2. Transcription de LIMK2-1 dans le système nerveux central	136
I.3. Expression de la protéine LIMK2-1.....	137
II. ETUDE MOLECULAIRE DE LIMK2-1	140
II.1. Structure de LIMK2-1 et hypothèse.....	140
II.2. Rôle de LIMK2-1 sur la polymérisation de l'actine.....	142
II.3. Rôle de LIMK2-1 sur la phosphorylation de la cofiline.....	146
II.4. Caractérisation du domaine PP1i	148
II.4.1. Interaction entre la phosphatase 1 et le domaine PP1i de LIMK2-1.....	148
III. CARACTERISATION DU VARIANT P.S668P	152
III.1. Association entre le variant p.S668P et la déficience intellectuelle.....	152
III.2. Impact moléculaire de la variation p.S668P	153
III.2.1. Formation de fibres de stress.....	153
III.2.2. Interaction entre PP1 et le domaine PP1i	155
III.3. Mise en place d'un modèle de neurodéveloppement humain.....	156
IV. ARTICLE SOUMIS DANS NEUROSCIENCE	158
DISCUSSION.....	177
CONCLUSION.....	195
BIBLIOGRAPHIE.....	199

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la NF1 (NIH, 1988).....	31
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour l'étude d'expression de <i>LIMK2-1</i>	115
Tableau 3 : Détail des plasmides utilisés	117
Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour les clonages.....	118
Tableau 5 : Séquences utilisées pour la construction de HA-LIMK2-1T596D	120
Tableau 6 : Conditions de digestion des produits de PCR et des plasmides	120
Tableau 7 : Plasmides transfectés pour étudier la phosphorylation de la cofiline.....	123
Tableau 8 : Plasmides transfectés pour étudier l'interaction entre PP1 et LIMK2-1	125
Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de GAP43 et de l'actine	129
Tableau 10 : Comparaison des profils de fibres de stress en fonction des transfections	145
Tableau 11 : Comparaison de profils de fibres de stress par rapport à HA-LIMK2-1S668P ...	155

Liste des figures

Figure 1 : Taches café-au-lait (Boyd et al., 2010)	32
Figure 2 : Ephélides (gauche) et lentigines (droite) (Stulberg et al., 2003).....	33
Figure 3 : Nodules de Lisch (Adams et al., 2011).....	33
Figure 4 : Tumeurs du système nerveux périphérique.....	34
Figure 5 : Anomalies squelettiques dans la NF1	35
Figure 6 : Schématisation des composantes associées aux fonctions exécutives	39
Figure 7 : Facteurs influençant le phénotype cognitif de la NF1	43
Figure 8 : Organisation génomique du locus de <i>NF1</i>	45
Figure 9 : Structure de la neurofibromine et protéines d'interaction.....	50
Figure 10 : Structure du domaine GRD de NF1	51
Figure 11 : Activité RasGAP.....	51
Figure 12 : Rôle de la neurofibromine sur la voie Ras.....	52
Figure 13 : Structure du domaine SecPH de NF1 (D'Angelo et al., 2006)	54
Figure 14 : Interactions entre NF1 et différentes voies de signalisation	58
Figure 15 : Schéma des différentes étapes du neurodéveloppement (Govek et al., 2005).	61
Figure 16 : Organisation génomique de <i>LIMK1</i> et de <i>LIMK2</i> chez <i>Homo sapiens</i>	64
Figure 17 : Schéma montrant les différents transcrits de LIMK1 et LIMK2.....	65
Figure 18 : Schéma montrant l'organisation protéique des LIM kinases.....	68
Figure 19 : Régulation des LIM kinases par les voies des RhoGTPases et la voie MAPK	70
Figure 20 : Modifications des LIM kinases	72
Figure 21 : Rôle de la protéine Hsp90 dans la régulation des LIM kinases.....	73
Figure 22 : Régulation des LIM kinases par la neurofibromine	76
Figure 23 : Dynamique de l'actine	79
Figure 24 : Organisation de l'actine dans une cellule en migration	80

Figure 25 : Les LIMK phosphorylent et inactivent la cofiline	81
Figure 26 : Polymérisation des microtubules	83
Figure 27 : L'actine et les microtubules lors de la mitose et de la migration cellulaire	83
Figure 28 : Rôle du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire.....	90
Figure 29 : Anticorps de lapin anti-PP1i	114
Figure 30 : Schéma des constructions utilisées.....	117
Figure 31 : Technique de mutagenèse dirigée.....	119
Figure 32 : Différentiation des SH-SY5Y, d'après Pasquali et al., 2014.....	128
Figure 33 : Séquence du domaine PP1i de <i>LIMK2-1</i> humaine	130
Figure 34 : Arbre phylogénique des primates	130
Figure 35 : Alignement de la séquence de référence d' <i>Homo sapiens</i> avec les séquences des autres hominidés	135
Figure 36 : Expression des ARNm de <i>LIMK2-1</i>	137
Figure 37 : Validation de l'anticorps anti-PP1i.....	138
Figure 38 : Expression de la protéine <i>LIMK2-1</i> dans le SNC.....	139
Figure 39 : Isoformes de <i>LIMK2</i> chez l'homme	140
Figure 40 : Comparaison des séquences de PPP1R14B et du domaine PP1i de <i>LIMK2-1</i>	141
Figure 41 : Modèle hypothétique de fonctionnement de l'isoforme <i>LIMK2-1</i>	141
Figure 42 : Constructions utilisées pour l'étude de la polymérisation de l'actine.....	142
Figure 43 : Catégories observées de fibres de stress	143
Figure 44 : Représentation graphique des proportions de cellules de chaque catégorie.....	144
Figure 45 : Phosphorylation de la cofiline <i>in cellulo</i>	147
Figure 46 : Constructions utilisées pour l'étude de l'interaction entre PP1 et <i>LIMK2-1</i>	149
Figure 47 : Interaction entre PP1 étiquetée Flag et les différentes isoformes de <i>LIMK2</i>	149
Figure 48 : Séquences protéiques de LARP6, <i>LIMK2-2a</i> , <i>LIMK2-2b</i> et <i>LIMK2-1</i>	150
Figure 49 : Alignement des séquences de l'exon codant PP1i chez les hominidés.....	152

Figure 50 : Evaluation de l'effet de la mutation par le logiciel Polyphen2	153
Figure 51 : Représentation graphique des proportions de cellules de chaque catégorie.....	154
Figure 52 : Constructions utilisées pour l'étude de la variation p.S668P	155
Figure 53 : Interaction entre PP1 et le domaine PP1i porteur de la mutation S668P.....	156
Figure 54 : Observation des SH-SY5Y au microscope optique	157
Figure 55 : Expression du marqueur de différenciation neuronale GAP43	157
Figure 56 : Voies régulées par NF1 et impliquées dans le système nerveux central.....	179
Figure 57 : Formation de dimères à partir des isoformes de LIMK2	185
Figure 58 : Synergie entre LIMK2-2a et LIMK2-1 sur la phosphorylation de la cofiline.....	186
Figure 59 : Modèle de fonctionnement synergique de LIMK2-2a et de LIMK2-1	186
Figure 60 : Prédiction des signaux de localisation nucléaire de LIMK2	188
Figure 61 : Impact de LIMK2-1 sur la déphosphorylation de la cofiline due à PP1	189

Liste des abréviations

ADI-R : Autism Diagnostic Interview-Revised
ADF : Actin-depolymerizing factor
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADOS-G : Autisme Diagnostic Schedule-Generic
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APP : Amyloid precursor protein
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BMP : Bone morphogenic protein
C3G : Céphalosporine
CALR : Calréticuline
CaMKIV : Calmodulin-dependent protein kinase IV
CDC42 : Cell division cycle 42
CDK : Cyclin-dependent kinase
CDKN2A : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CIN : Chronophin
CNV : Variation du nombre de copies
CpG : Cytosine phosphate guanine
CREB : cAMP-response element binding-protein
CRMP-2 : Collapsin response mediator protein 2
CSRD : Cystein and serin rich domain
CTD : C-terminal domain
CYTH4 : Cytohésine 4
DAOA : D-amino acid oxidase activator
DDAH : N^G, N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase
DGCR6L : DiGeorge syndrome critical region gene 6-like
DI : Déficience intellectuelle
DS : Déviation standard
DSM5 : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5^e edition
DPYSL2 : Dihydropyrimidinase-like 2
EGF : Epidermal growth factor
Ena/VASP : Protein enable homolog/Vasodilator-stimulated phosphoprotein

ERK : Extracellular signal-regulated kinase
EV12A/B : Ectopic viral integration site A/B
FAF2 : FAS-associated factor 2
FAK : Focal adhesion kinase
FGF2 : Fibroblast growth factor 2
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GAP : GTPase activated protein
GAP43 : Growth Associated Protein 43
GDP : Guanosine diphosphate
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GEF : Guanine exchange factor
GRD : GAP-related domain
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3
GTP : Guanosine triphosphate
HA : Hémagglutinine
HDAC6 : Histone deacetylase 6
HIC-5 : Hydrogen peroxide-inducible clone-5
HSP : Heat shock protein
IRA1/2 : Inhibitory regulator protein 1/2
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JLO : Judgment of Line Orientation
KBTBD7 : Kelch repeat and BTB domain-containing 7
KCNH2 : Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2
LARP6 : La-related protein 6
LATS1 : Large tumor suppressor 1
LCR : Low copy repeat
LIM : Lin11, Isl-1, Mec-3
LIMK : LIM kinase
LRPPRC : Leucin-rich pentatricopeptide
LTP : Potentialisation à long terme
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MAPKAPK2/MK2 : MAPK-activated protein kinase 2
MBP : Myelin basic protein
miR : Micro-ARN

MOCA : Modifier of cell adhesion
MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor
MRCK α : Myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase α
MT : Microtubules
mTor : Mammalian target of rapamycine
MZF-1 : Myeloid zinc finger 1
NF1 : Neurofibromatose de type 1/Neurofibromine
NIH : National Institute of Health
NLS : Nuclear localization signal
NOS : Oxyde nitrique synthase
NSC : Cellules souches neurales
NURR1 : Nuclear receptor related 1 protein
OBNI : Objets brillants non identifiés
OMG : Oligodendrocyte myelin glycoprotein
PAK1 : p21-activated kinase 1
PAR3 : Protease activated receptor 3
PDGF : Platelet-derived growth factor
PDZ : PSD95, DigA, ZO-1
PHI-1 : Protein phosphatase-1 inhibitor protein
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKA : Protéine kinase A
PKC α : Protéine kinase C α
PKC ζ : Protéine kinase C ζ
PP1/2A : Protein phosphatase 1/2A
PP1i : Protein phosphatase 1 inhibitor
PP1R14B : Protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 14B
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
QI : Quotient intellectuel
RAC1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA : Ras homolog gene family, member A
RNF : Ring finger protein
ROCK : Rho-associated protein kinase
ROR α 1 : RAR-related orphan receptor α isoform 1
SBD : Syndecan-binding domain

SDF-1 : Stroma cell-derived factor 1
SSH : Slingshot
SNP : Single nucleotide polymorphism
SPRED1 : Sprouty-related protein with an EVH domain 1
SUZ12 : Suppressor of Zeste 12 protein homolog
TBD : Tubulin-binding domain
TCL : Taches café au lait
TDAH : Troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité
TESK : Testis-specific protein kinase
TPPP : Tubulin polymerization promoting protein
TSA : Troubles du spectre autistique
Ub : Ubiquitine
VCP : Valosin-containing protein
VEGF : Vascular endothelial growth factor
WISC : Wechsler intelligence scale

Introduction

La neurofibromatose de type 1 est une pathologie caractérisée par un tableau clinique complexe, dont les symptômes les plus invalidants sont l'apparition de tumeurs, pouvant dégénérer en cancers, et les troubles cognitifs. L'étiologie génétique de cette pathologie est connue et due à des mutations du gène codant la neurofibromine (NF1). Le rôle moléculaire de cette protéine a été largement étudié, et sa fonction la plus connue est la régulation de la voie Ras.

La voie des LIM kinases, moins étudiée dans le contexte de la neurofibromatose de type 1, est également régulée par NF1. Les LIM kinases comprennent deux membres, LIMK1 et LIMK2, qui pourraient être impliqués à la fois dans les aspects tumoraux et cognitifs de cette maladie par leur rôle dans la dynamique de l'actine et le réarrangement des microtubules.

Le travail présenté dans ce manuscrit fait suite à une première thèse, portant sur le rôle de LIMK2 dans l'autisme et la déficience intellectuelle (Tastet, 2012). Au cours de cette thèse, il a été montré que l'isoforme LIMK2-1 de LIMK2 était spécifique des primates et qu'un variant de cette isoforme était associé à la déficience intellectuelle. Dans ce travail, nous avons voulu caractériser cette isoforme d'un point de vue cellulaire et moléculaire afin de mieux comprendre son rôle dans la déficience intellectuelle et dans la neurofibromatose de type 1.

Ce manuscrit débute par une introduction qui se divise en deux parties. La première décrit la neurofibromatose de type 1, les symptômes qui lui sont associés ainsi que le rôle moléculaire de la neurofibromine et vise à replacer les LIM kinases dans le contexte de cette pathologie. La deuxième porte sur les LIM kinases et décrit le rôle physiopathologique de ces protéines, à la fois dans la tumorigenèse et dans les dysfonctions neuronales. Ce chapitre se termine par une revue de la littérature, publiée dans FEBS Letters, et portant sur le rôle des LIMK dans les fonctions et dysfonctions du système nerveux.

Nous présentons ensuite les objectifs de ce travail et le matériels et méthodes, puis nous exposons les résultats, divisés en trois parties : une étude d'expression, une étude moléculaire et une caractérisation du variant p.S668P associé à la déficience intellectuelle. La première partie, ainsi que des résultats issus de la troisième partie et de la thèse précédente, font l'objet d'un manuscrit soumis dans Neuroscience et présenté à la fin des résultats. La deuxième partie permettra d'écrire un second article, en collaboration avec le Dr. Béatrice Vallée de l'équipe du Dr. Bénédicti, sur les isoformes de LIMK2. Enfin, ce manuscrit se termine par une discussion de nos résultats et une conclusion.

I. La neurofibromatose de type 1

I.1. Historique

La première description d'un malade atteint de neurofibromatose remonte au XIII^e siècle dans un manuscrit hongrois écrit par le moine Henricus. Au XVI^e siècle, Aldrovandi de Bologne décrit une tumeur spécifique de la neurofibromatose de type 1 (NF1) : le neurofibrome plexiforme.

En 1768, le médecin anglais Mark Akenside rapporte le cas d'un malade porteur de nombreuses « verrues » parsemant son corps et évoque la possibilité d'une transmission familiale de la pathologie. Par la suite, en 1873, le médecin et naturaliste allemand Wilhelm G. von Tilesius décrit un patient atteint de multiples tumeurs fibreuses visibles.

Ces observations sont synthétisées en 1882 par le médecin allemand Friedrich D. von Recklinghausen qui propose une description précise de la pathologie ainsi que le terme de « neurofibrome » (de « neuro » pour les nerfs et « fibroma » pour le tissu fibreux). Il est également le premier à noter que ces neurofibromes se développent à partir de la gaine de myéline des neurones périphériques. La formation des neurofibromes est commune à chacune des entités nosologiques regroupées sous le terme de neurofibromatose. La distinction entre ces entités ne se fera que près d'un siècle plus tard, suite à la création en 1978 de la « National Neurofibromatosis Foundation » (actuelle « Children's Tumor Foundation »). Cette association favorise les interactions entre scientifiques et cliniciens et participe à l'établissement de critères diagnostiques qui permettront de caractériser spécifiquement la NF1 (Korf and Rubenstein, 2005; NIH, 1988).

A la fin de années 1980, le locus associé à la NF1 est identifié dans la région péricentromérique du chromosome 17 (Barker et al., 1987; Seizinger et al., 1987), trois ans avant la localisation précise du gène responsable de la maladie (Viskochil et al., 1990; Wallace et al., 1990).

I.2. Epidémiologie

La NF1 est une maladie génétique à transmission autosomique dominante et représente l'une des maladies génétiques les plus fréquentes, indépendamment du groupe ethnique. Son incidence à la naissance est estimée à environ 1/2700 et sa prévalence à 1/4500 (Evans et al., 2010). La maladie est héritée de l'un des deux parents dans 50 % des cas, les autres cas résultant de mutations *de novo* (Friedman and Riccardi, 1999; Gutmann et al., 1997; Huson et al., 1988; Lammert et al., 2005).

I.3. Clinique

I.3.1. Principaux signes cliniques

I.3.1.1. Critères diagnostiques

La NF1 se caractérise notamment par la présence sur la peau de taches café-au-lait (TCL) et de multiples neurofibromes, par des tumeurs bénignes du système nerveux central et des anomalies osseuses. Dans 50 à 70 % des cas, des troubles d'apprentissage sont également rapportés. Les symptômes de la maladie sont extrêmement variables d'un individu à l'autre, même au sein d'une même famille, ce qui peut rendre le diagnostic difficile. En 1987, la conférence du National Institute of Health (NIH) a établi une liste de 7 critères caractéristiques de la NF1 (Tableau 1). Le diagnostic est posé lorsque deux des signes proposés sont réunis chez un même patient (NIH, 1988; Szudek et al., 2003).

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la NF1 (NIH, 1988)

-
1. Un apparenté du premier degré atteint
 2. Au moins 6 taches café-au-lait
 - > 5 mm avant la puberté
 - > 15 mm après la puberté
 3. Des éphélides intertrigineuses ou lentigines
 4. Deux nodules de Lisch
 5. Deux neurofibromes cutanés ou un neurofibrome plexiforme
 6. Un gliome du nerf optique
 7. Une lésion osseuse caractéristique
-

Bien que les symptômes soient connus et bien décrits, leur évolution à l'échelle individuelle reste imprévisible et peut aboutir, dans certains cas, à l'apparition de nombreuses complications. A ce jour, seuls les symptômes peuvent être pris en charge. Il n'existe aucun traitement étiologique global de la maladie.

I.3.1.2. Taches café-au-lait (TCL)

Les TCL sont des lésions cutanées bénignes (Figure 1). Elles sont caractérisées par une couleur uniforme allant du brun clair au brun foncé, des contours réguliers et un diamètre variable, compris entre quelques millimètres et une vingtaine de centimètres. Elles apparaissent précocement, entre la naissance et les deux premières années de la vie, et sont présentes chez 95 % des patients âgés de plus de 8 ans (DeBella et al., 2000). Leur nombre et leur taille constituent l'un des premiers critères diagnostiques de la NF1. Ainsi, pour être diagnostiqué, un patient doit avoir au moins 6 TCL mesurant au moins 0,5 cm chez l'enfant et 1,5 cm chez l'adulte (Tableau 1). Les TCL ne montrent pas de tendance à la transformation maligne (Williams et al., 2009).



Figure 1 : Taches café-au-lait (Boyd et al., 2010)

I.3.1.3. Ephélides intertrigineuses ou lentigines

Les éphélides sont des taches de petite taille, communément appelées « taches de rousseur » dans la population générale. Chez les patients atteints de NF1, elles sont localisées spécifiquement au niveau des plis axillaires, inguinaux ou sous-mammaires et sont alors appelées éphélides intertrigineuses ou lentigines (Figure 2). Elles apparaissent entre 3 et 5 ans (Korf, 2002). Leur prévalence est comprise entre 80 % chez l'enfant de 4 ans et 90 % chez l'adulte (Friedman, 1999; Huson et al., 1988). Il s'agit donc d'un signe diagnostique important (Tableau 1).



Figure 2 : Ephérides (gauche) et lentiginos (droite) (Stulberg et al., 2003)

I.3.1.4. Nodules de Lisch ou hamartomes iriens

Les nodules de Lisch sont des hamartomes, ou malformations tissulaires d'aspect tumoral, localisés à la surface de l'iris et asymptomatiques (Figure 3). Ces malformations sont facilement détectables par un examen ophtalmologique (Williams et al., 2009). Elles constituent un signe spécifique de la pathologie mais ne permettent pas de poser un diagnostic précoce. En effet, elles ne sont présentes que chez 53 % des patients de moins de 10 ans, alors que 100 % des patients de plus de 29 ans en sont atteints (Beauchamp, 1995).

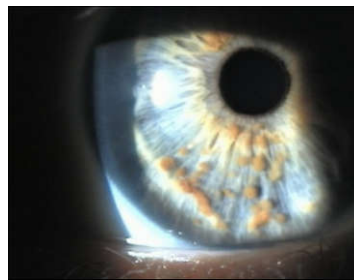


Figure 3 : Nodules de Lisch (Adams et al., 2011)

I.3.1.5. Tumeurs du système nerveux

I.3.1.5.1. Tumeurs du système nerveux périphérique

La NF1 est caractérisée par l'apparition de neurofibromes, qui sont des tumeurs bénignes issues de la gaine de myéline des neurones périphériques. Ce sont des tumeurs hétérogènes composées de cellules de Schwann, de fibroblastes, de cellules périneurales et de mastocytes.

En dépit de l'absence d'un système de classification standard, les neurofibromes peuvent être classés en quatre catégories, en fonction de leur apparence et de leur localisation : les neurofibromes cutanés, sous-cutanés, spinaux et plexiformes (Williams et al.,

2009) (Figure 4). Les neurofibromes cutanés sont des tumeurs bénignes de petite taille qui apparaissent dans la petite enfance ou au cours de la puberté. Ils touchent 95 % des patients atteints de NF1. Les neurofibromes sous-cutanés sont des nodules bénins. Ils apparaissent à partir de la puberté chez 20 % des patients. Les neurofibromes spinaux sont des tumeurs bénignes localisées au niveau de la racine des nerfs. Ils touchent entre 30 et 40 % des patients et induisent des déficits moteurs et/ou sensitifs dans 5 % des cas (Poyhonen et al., 1997). Les neurofibromes plexiformes sont des tumeurs de tailles très variables, comprises entre quelques centimètres et plusieurs dizaines de centimètres. Ils se développent le long des nerfs et peuvent s'étendre autour de structures telles que les muscles, les os ou les organes internes. Ils sont observés chez 30 % des patients mais ces données n'incluent pas les patients atteints de lésions internes, visibles uniquement par IRM (Mautner et al., 2006). Les neurofibromes plexiformes sont très invalidants du fait des douleurs neurogènes et des déformations inesthétiques qu'ils provoquent. Dans 10 % des cas, ils peuvent dégénérer en tumeurs malignes appelées neurofibrosarcomes ou MPNST pour Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (Evans et al., 2002). Les MPNST sont le plus souvent résistants aux traitements classiques (chimiothérapie, radiothérapie) et sont responsables d'une diminution importante de la durée de vie moyenne des patients atteints de NF1 (Rasmussen et al., 2001; Zou et al., 2009).

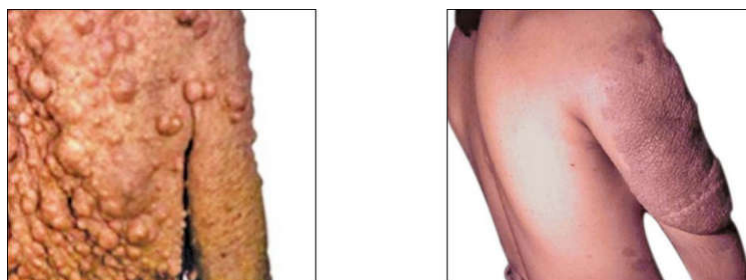


Figure 4 : Tumeurs du système nerveux périphérique
Neurofibromes cutanés de tailles variables (à gauche) et neurofibrome plexiforme (à droite)
(Antônio et al., 2013).

1.3.1.5.2. Tumeurs du système nerveux central

La NF1 se caractérise également par l'apparition de tumeurs développées à partir du système nerveux central et, plus particulièrement, de gliomes optiques. Les gliomes optiques sont des tumeurs bénignes qui se développent le long du nerf optique. D'un point de vue

histologique, il s'agit le plus souvent d'astrocytomes pilocytiques de bas grade (Rosser and Packer, 2002). Ces tumeurs sont retrouvées chez 15 % des patients atteints de NF1 et apparaissent habituellement au cours des dix premières années de la vie (Listernick et al., 1999). Dans un tiers à la moitié des cas, les gliomes des nerfs optiques chez les patients atteints de NF1 provoquent une baisse de l'acuité visuelle pouvant aller jusqu'à la cécité. Ils peuvent également être associés à une puberté précoce, si la tumeur se développe à proximité de l'hypothalamus (Friedman, 2002).

I.3.1.6. Anomalies squelettiques

Des anomalies squelettiques apparaissent chez 38 % des patients (Crawford and Schorry, 1999), dont la densité osseuse peut être légèrement inférieure à celle observée dans la population générale (Stevenson et al., 2007). Ces anomalies peuvent inclure des dysplasies osseuses, une ostéoporose ou des scoliose (Figure 5). La scoliose affecte 10 à 26 % des patients (Dulai et al., 2007). Sa forme la plus sévère, présente dans moins de 10 % des cas, peut entraîner une compression de la moelle épinière pouvant aboutir, dans certains cas, à une paralysie des membres inférieurs (Akbarnia et al., 1992; Williams et al., 2009).



Figure 5 : Anomalies squelettiques dans la NF1
Dysplasie osseuse (à gauche) et scoliose (à droite) (Antônio et al., 2013; Williams et al., 2009).

I.3.1.7. Manifestations vasculaires

Des pathologies vasculaires sont observées dans 7 % des cas de neurofibromatose (Oderich et al., 2007; Rea et al., 2009). Leur prévalence reste néanmoins difficile à évaluer, ces pathologies n'étant pas systématiquement recherchées chez les patients. Les manifestations vasculaires peuvent toucher tous les vaisseaux, principalement l'aorte et les artères rénales, et peuvent conduire à des obstructions ou des anévrismes.

I.3.2. Profils cognitifs et troubles associés

I.3.2.1. Déficience intellectuelle

I.3.2.1.1. Définition

La déficience intellectuelle (DI) est la cause la plus fréquente d'handicap sévère chez l'enfant dans les pays développés, avec une prévalence comprise entre 1 et 3 % (Perou et al., 2013). La DI apparaît avant l'âge de 18 ans. Elle se caractérise par des troubles des aptitudes cognitives impactant le fonctionnement adaptatif dans trois domaines (conceptuel, social et pratique) qui déterminent la capacité à gérer les tâches quotidiennes.

Le domaine conceptuel inclut la compréhension verbale, le raisonnement perceptif, la mémoire de travail et la vitesse de traitement des informations. Ce domaine est évalué par le quotient intellectuel (QI) mesuré par l'échelle révisée d'intelligence de Wechsler (WISC-R). Un patient est diagnostiqué déficient intellectuel lorsque son QI est inférieur à 70, ce qui correspond à deux déviations standard (DS) en-dessous de la moyenne de la population générale ($m=100$; $DS=15$). On distingue généralement la DI légère ($69 > QI > 50$), modérée ($49 < QI < 35$), sévère ($34 < QI < 20$) et profonde ($QI < 20$).

Le domaine social se centre sur l'empathie, le jugement social et les capacités de communication interpersonnelle. Le domaine pratique, quant à lui, se réfère aux compétences de la vie quotidienne qui incluent la capacité à s'autogérer en ce qui concerne sa santé, dans le cadre de son emploi ou de la gestion de son argent, ainsi que dans l'organisation des tâches à l'école ou au travail. Ce domaine inclut également la motricité, globale et fine. Ces deux derniers domaines s'évaluent par l'échelle du comportement adaptatif de Vineland-II (American Psychiatric Association et al., 2013).

La DI peut être non-syndromique, quand le déficit intellectuelle est la seule manifestation clinique observée, ou syndromique, lorsqu'elle est associée à d'autres manifestations tels que des malformations, des signes neurologiques, des déficiences sensorielles, de l'épilepsie ou des troubles du comportement (Srivastava and Schwartz, 2014).

1.3.2.1.2. *Efficiences intellectuelle globale dans la NF1*

Plusieurs études montrent un léger décalage vers la gauche de la distribution du QI chez les patients atteints de NF1, avec une déviation standard par rapport à la moyenne de la population générale et un QI moyen compris entre 89 et 98. D'autres travaux montrent que 4 à 8 % des patients atteints de NF1 présentent une déficience intellectuelle (QI<70), soit une incidence 1 à 3 fois plus élevée que celle observée dans la population générale (Acosta et al., 2006; Levine et al., 2006; North et al., 2002).

1.3.2.2. *Les troubles spécifiques d'apprentissage*

Les troubles spécifiques d'apprentissage sont définis par le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5^e édition (DSM5) comme des difficultés persistantes dans une ou plusieurs aptitudes académiques : (1) lecture de mots inexacte, lente ou laborieuse ; (2) difficultés à comprendre la signification de ce qui est lu ; (3) difficultés en orthographe ; (4) difficultés dans l'expression écrite ; (5) difficultés à maîtriser le sens des nombres, les faits numériques ou le calcul ; (6) difficultés dans le raisonnement mathématique. Par définition, les capacités dans ces aptitudes sont significativement en-dessous de celles attendues pour l'âge et les difficultés ne s'expliquent pas par un trouble du développement intellectuel, un retard de développement global ou des troubles neurologiques, sensoriels ou moteurs. Enfin, les difficultés d'apprentissage interfèrent de manière significative avec la réussite scolaire, le fonctionnement professionnel ou les activités de la vie courante. Les troubles de l'apprentissage sont évalués par la discordance entre les performances académiques et le niveau attendu compte-tenu de l'âge et du niveau intellectuel (Albaret and Chaix, 2013; American Psychiatric Association et al., 2013).

Les troubles spécifiques de l'apprentissage touchent environ 50 % des patients atteints de NF1 (Descheemaeker et al., 2005; Hyman et al., 2005, 2006). Ils concernent chacune des aptitudes académiques décrites : la lecture (Billingsley et al., 2003; Cutting et al., 2000; Ferner et al., 1996; North et al., 1994, 1995) et la compréhension de texte (Billingsley et al., 2004; Cutting et al., 2000; North et al., 1994), l'orthographe (Billingsley et al., 2003), la numération (Billingsley et al., 2003; Cutting et al., 2000; Hyman et al., 2003) et le raisonnement mathématique (Billingsley et al., 2004; Cutting et al., 2000; Dilts et al., 1996; Mazzocco et al.,

1995). L'incidence de ces troubles peut différer en fonction des définitions utilisées et de la prise en compte ou non du QI (Hachon et al., 2011).

Dans une étude publiée en 2005, Hyman et collaborateurs montrent une incidence des troubles d'apprentissage plus élevée chez les hommes (37 %) que chez les femmes (5 %) (Hyman et al., 2005). Une étude plus récente corrobore ce travail en montrant un rôle du sexe dans la dysfonction neuronale chez des modèles murins de NF1 (Diggs-Andrews et al., 2014).

I.3.2.3. Les déficits visuo-spatiaux

Le traitement visuo-spatial intègre un ensemble de processus cognitifs impliqués dans la distinction, par la vue, de la position relative des objets dans l'environnement ou par rapport à soi. L'altération de ces processus est caractéristique du profil cognitif de la NF1 et peut être mesurée par le test d'orientation de lignes de Benton ou judgment of line orientation (JLO) en anglais. Ainsi, de nombreuses études ont rapporté que 80 % des enfants atteints de NF1 montraient des déficits pour ce test, quels que soient les contrôles utilisés (Billingsley et al., 2003; Clements-Stephens et al., 2008; Dilts et al., 1996; Eldridge et al., 1989; Hofman et al., 1994; Hyman et al., 2003; Mazzocco et al., 1995; Schrimsher et al., 2003).

Il est intéressant de noter que la plupart des autres tests ne permettent pas d'obtenir une telle discrimination (Billingsley et al., 2003; Eldridge et al., 1989; Hofman et al., 1994; Moore et al., 2000; Schrimsher et al., 2003). Le JLO implique à la fois les capacités visuo-spatiales, la mémoire de travail, l'attention visuelle et les compétences visuo-motrices. Des troubles dans chacune de ces capacités peuvent conduire à un échec du test. Les différences de résultats entre le groupe de patients atteints de NF1 et le groupe témoin persistent lorsque les troubles de l'attention sont pris en considération (Schrimsher et al., 2003), de même lorsque les compétences visuo-motrices et la mémoire visuelle sont contrôlées (Hyman et al., 2005). De ce fait, les résultats du test peuvent être principalement imputés aux capacités visuo-spatiales.

Au niveau cérébral, le JLO est basé sur le recrutement des aires dévolues au traitement visuel (aires pariétales et occipitales). Une implication cérébrale plus diffuse a été montrée par imagerie lors de la résolution de ce test, avec le recrutement en particulier du lobe frontal, impliqué dans les fonctions exécutives (Levine et al., 2006). Ces fonctions désignent un ensemble de processus cognitifs permettant un comportement flexible et adapté au contexte

(Figure 6). Elles pourraient donc également être impliquées dans les difficultés à résoudre le JLO chez les enfants atteints de NF1. Plusieurs autres études suggèrent un déficit des fonctions exécutives chez les enfants atteints (Eliason, 1986; Ferner et al., 1996; Hofman et al., 1994; Mazzocco et al., 1995; North et al., 1995), qui persisterait à l'âge adulte et concernerait le raisonnement inductif, les capacités d'abstraction et la flexibilité mentale (Acosta et al., 2006; Zöllner et al., 1997).

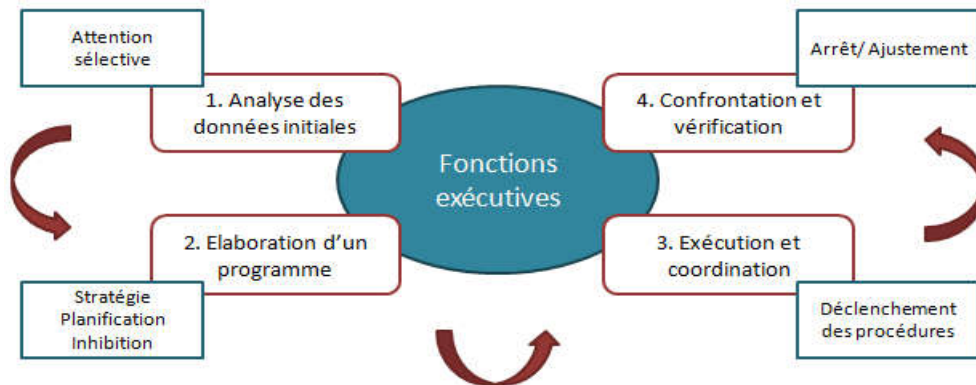


Figure 6 : Schématisation des composantes associées aux fonctions exécutives

Les fonctions exécutives peuvent se présenter sous forme d'une élaboration successive en quatre phases : analyse des données initiales, élaboration d'un programme organisant et ordonnant les différentes activités nécessaires à la réalisation de la tâche proposée, exécution du programme et confrontation du résultat avec les données initiales.

1.3.2.4. Les troubles moteurs

La motricité globale et la motricité fine sont touchées dans la NF1 (Hofman et al., 1994; Hyman et al., 2005). Les enfants atteints montrent des troubles de la dextérité manuelle, de la coordination motrice fine, de l'équilibre et de la coordination œil-main (Hofman et al., 1994; North et al., 1994, 1995). De plus, la coordination motrice chez les patients est associée aux capacités visuo-spatiales tandis que la vitesse motrice est corrélée à la vitesse de traitement de l'information. Ces études soulignent l'importance du rôle moteur dans les performances cognitives des enfants atteints de NF1 (Acosta et al., 2006; Hyman et al., 2005).

1.3.2.5. Les troubles mnésiques

La moitié des études sur la NF1 rapportent des troubles de la mémoire verbale et de la mémoire visuelle (Billingsley et al., 2003; Dilts et al., 1996; Ferner et al., 1996; Hofman et al., 1994). Certaines suggèrent que la mémoire verbale serait plus touchée que la mémoire

visuelle (Hyman et al., 2005; Levine et al., 2006). Il semble important de noter que la mémoire est une construction cognitive complexe qui interagit étroitement avec les fonctions exécutives. D'autres études sont requises pour affiner ces résultats. Les troubles de la mémoire verbale pourraient découler de troubles du langage ou de l'attention, ou être associés à des déficits visuo-spatiaux (Acosta et al., 2006; Levine et al., 2006).

I.3.2.6. Les troubles du comportement

I.3.2.6.1. Troubles du déficit de l'attention et hyperactivité

Les troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH) constituent l'un des troubles de l'enfance les plus fréquents et peut se prolonger à l'adolescence et à l'âge adulte. Les symptômes incluent des difficultés à rester concentré et des comportements d'hyperactivité et/ou d'impulsivité. Entre 30 et 50 % des enfants atteints de NF1 présentent des TDAH (Hyman et al., 2005; Kayl et al., 2000; Koth et al., 2000; Schrimsher et al., 2003). Chez 32 familles, Koth et collaborateurs ont montré une fréquence de 42 % de TDAH parmi les enfants atteints de NF1, contre 13 % chez leurs apparentés sains, faisant ainsi des TDAH l'un des troubles caractéristiques du profil cognitif associé à la NF1. En outre, plusieurs études ont montré que le profil observé chez les patients était plus un profil d'inattention qu'un profil d'hyperactivité ou d'impulsivité, à l'inverse de ce qui est observé dans la population générale (Eliason, 1986; Noll et al., 2007; North et al., 1995).

Les TDAH sont communément associés aux troubles des fonctions exécutives, et de nombreuses études portant sur cet aspect de la cognition suggèrent une corrélation entre la NF1 et des déficits des fonctions exécutives (Descheemaeker et al., 2005; Ferner et al., 1996; Hofman et al., 1994; Mazzocco et al., 1995). Cependant, peu d'études examinent réellement la relation entre fonctions exécutives et TDAH.

I.3.2.6.2. Troubles du spectre autistique

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont définis par des troubles des interactions sociales et de la communication ainsi que par un comportement restreint et répétitif (American Psychiatric Association et al., 2013). La prévalence est estimée à 1 individu sur 100 par le National Institut of Mental Health. Les études portant sur des cohortes de patients atteints de NF1 font état de troubles sociaux fréquents, d'une tendance à l'isolement (Noll et

al., 2007), d'une difficulté à traiter les informations sociales et à reconnaître les émotions (Huijbregts et al., 2010). En 2013, Garg et collaborateurs ont mené une étude visant à diagnostiquer les TSA chez les patients atteints de NF1 en utilisant plusieurs échelles d'évaluation : l'ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised) (Lord et al., 1994), l'ADOS-G (Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic) (Lord et al., 2000), l'échelle du comportement adaptatif de Vineland-II et l'échelle abrégée d'intelligence de Wechsler. Ils ont ainsi montré une prévalence de 24,9 % de TSA dans la NF1. De plus, leur évaluation du QI verbal ne permettait pas de déceler de différences entre le groupe de patients atteints de NF1 et le groupe témoin. Ces résultats suggèrent que les symptômes autistiques observés ne résultent pas seulement de troubles d'apprentissage et proposent ainsi l'intégration des TSA dans les caractéristiques cognitives de la NF1 (Garg et al., 2013).

I.3.2.7. Cognition et anomalies neurologiques

I.3.2.7.1. Macrocéphalie et mégalencéphalie

La macrocéphalie et la mégalencéphalie correspondent respectivement à un volume de la tête et du cerveau supérieur à la moyenne et sont retrouvés chez 50 % des patients atteints de NF1 (Cutting et al., 2000, 2002; North et al., 1994). Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre fonctions cognitives et macrocéphalie (Ferner et al., 1996; North et al., 1994). En revanche, plusieurs études ont montré une corrélation entre fonctions cognitives et mégalencéphalie. Ainsi, Cutting et collaborateurs ont observé une diminution significative du vocabulaire chez les patients atteints de NF1 présentant une mégalencéphalie (Cutting et al., 2002). Said et collaborateurs ont mis en évidence une corrélation positive entre la performance au JLO et la matière grise. Ils ont également montré une augmentation de la matière blanche chez les patients atteints de NF1 présentant une mégalencéphalie (Said et al., 1996).

I.3.2.7.2. Objets brillants non identifiés

Les objets brillants non identifiés, ou OBNI, sont des hypersignaux visibles à l'IRM au niveau du cerveau et dont l'origine est inconnue (Hyman et al., 2003). Ils sont considérés comme des lésions dysplasiques ou hamartomateuses. Une hypothèse émise par certains auteurs est que ces lésions pourraient correspondre à une myélinisation anormale transitoire

avec vacuolisation de la myéline. Les OBNI sont observés chez environ 70 % des patients atteints de NF1 (Hyman et al., 2007; Lopes Ferraz Filho et al., 2008) et leur intensité décroît avec l'âge (Gill et al., 2006; Hyman et al., 2003). Les OBNI sont typiquement observés dans la région sous-corticale, en particulier au niveau des ganglions de la base, du thalamus, du cervelet et du tronc cérébral (Moore et al., 1996; North, 2000). Leur localisation a été corrélée aux troubles cognitifs dans la NF1. Par exemple, des OBNI sont observés au niveau du thalamus chez des patients présentant des fonctions intellectuelles amoindries. De même, des OBNI localisés au niveau du globus pallidus gauche et du pédoncule cérébelleux moyen droit ont été associés à des troubles de l'attention et une baisse des capacités sensitivo-motrice, respectivement (Goh et al., 2004; Hyman et al., 2007).

I.3.3. Facteurs d'hétérogénéité clinique

La NF1 est une maladie monogénique dont le gène responsable, *NF1*, a été clairement identifié. C'est une pathologie dont la pénétrance est complète et l'expressivité extrêmement variable d'un individu à l'autre. Cette différence de phénotype peut s'expliquer, en partie, par le type de mutation rapportée (voir paragraphe 1.4.2.). Toutefois, il a également été noté que des individus d'une même famille, portant la même mutation, pouvaient avoir des phénotypes très différents. Il semble aussi qu'un certain nombre d'autres facteurs puissent agir sur le phénotype, en addition aux mutations du gène *NF1*. Ces facteurs ont commencé à être élucidés dans les cancers grâce à des modèles murins chez lesquels le timing d'inactivation du deuxième allèle de *NF1* (Bajenaru et al., 2002; Le et al., 2011; Zhu et al., 2005a), le type cellulaire (Alcantara Llaguno et al., 2009; Bajenaru et al., 2003; Le et al., 2009; Lee et al., 2010, 2012; Zhu et al., 2002, 2005b), la souche génétique (Hawes et al., 2007; Reilly et al., 2000, 2004) et le microenvironnement cellulaire non néoplasique (Bajenaru et al., 2003; Dagainakatte and Gutmann, 2007; Dagainakatte et al., 2008; Simmons et al., 2011) jouent des rôles critiques et déterminants sur le phénotype observé.

Ces facteurs se retrouvent également dans les troubles cognitifs (Figure 7). Ainsi, le type de mutation, l'expression allélique et les modifications génomiques, dont les méthylations de l'ADN, pourraient influencer l'hétérogénéité clinique et créer des variations d'expression de *NF1* dans les différents types cellulaires. L'hétérogénéité des sous-populations neuronales pourrait également être un facteur influençant le phénotype

cognitif global. Ainsi, la contribution relative des différentes populations de neurones (neurones GABAergiques et dopaminergiques, par exemple) pourrait conduire à un spectre distinct d’anomalies cognitives et comportementales. De même, des caractéristiques moins bien étudiées, tels que le sexe, l’âge du patient ou les anomalies cérébrales associées à la neurofibromatose de type 1 (OBNI, mégalencéphalies), pourraient également participer à l’apparition des différents profils cognitifs observés. De plus, l’effet d’une signalisation aberrante *via* des voies moléculaires spécifiques pourrait affecter de manière différentielle les populations de neurones et mener à des phénotypes cognitifs spécifiques. Il est également possible que les oligodendrocytes, la microglie et/ou les astrocytes de cellules *NF1*^{+/-} contribuent à un fonctionnement neuronal anormal, avec pour résultat des troubles de la propagation du signal axonal, de la plasticité synaptique ainsi que des modifications dans la disponibilité du glutamate ou d’autres neurotransmetteurs (Diggs-Andrews and Gutmann, 2013).

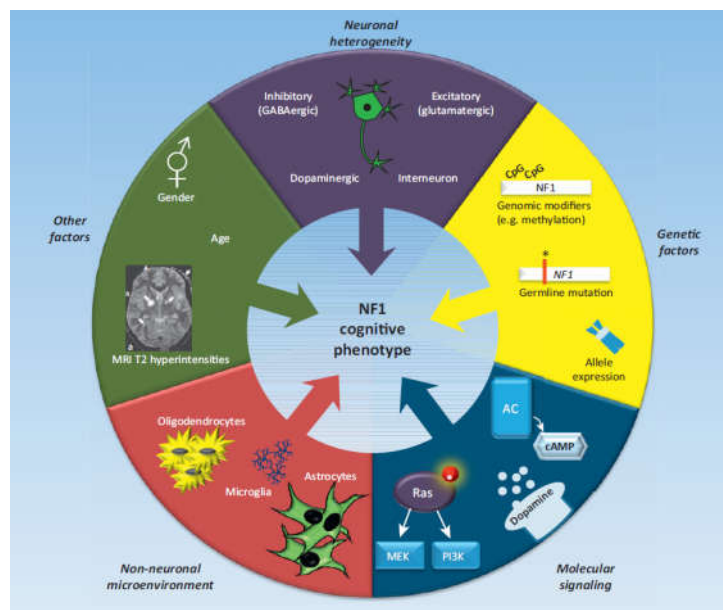


Figure 7 : Facteurs influençant le phénotype cognitif de la NF1
 Les phénotypes observés reflètent l’interaction entre des facteurs génomiques, moléculaires, cellulaires et environnementaux (Diggs-Andrews and Gutmann, 2013).

I.4. Aspects génétiques

I.4.1. Description du gène

Le gène *NF1* est localisé dans la région péricentromérique du bras long du chromosome 17 (17q11.2). Il contient 57 exons constitutifs et 4 exons alternatifs (9a, 10a-2, 23a et 48a) répartis sur 350 kb d'ADN génomique (Trovó-Marqui and Tajara, 2006). Il code une protéine appelée neurofibromine. Les introns 1 et 35 (1 et 27b selon l'ancienne numérotation) ont chacun plus de 60 kb. L'intron 35 a la particularité d'inclure 3 autres gènes transcrits en sens inverse de *NF1* : *EV12A* (*Ectopic Viral Integration Site*), *EV12B* et *OMG* (*Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein*) (Li et al., 1995). *EV12A* et *EV12B* codent deux protéines dont les homologues chez la souris sont associés au développement de leucémies. *OMG* code une glycoprotéine membranaire exprimée dans le système nerveux central au cours de la myélinisation (Habib et al., 1998). Elle est impliquée dans l'inhibition de la croissance des neurites par l'intermédiaire du récepteur Nogo ainsi que dans la potentialisation à long terme (LTP) (Raiker et al., 2010; Wang et al., 2002). Le gène *NF1* est très conservé au cours de l'évolution. Il présente 90 % d'identité entre l'homme et la souris et 60 % entre l'homme et la drosophile (Bernards et al., 1993)

I.4.2. Mutations du gène *NF1*

A ce jour, plus de 1485 variants pathogènes ont été décrits (Stenson et al., 2008). Ils incluent des variations du nombre de copies (CNV) et des mutations ponctuelles. Le taux d'apparition de ces variations est estimé à 10^{-4} par gamète et par génération, soit un taux 100 fois supérieur à celui décrit habituellement pour un gène chez les mammifères (Gottfried et al., 2006). Cela peut expliquer le fait que 50 % des cas de neurofibromatose de type 1 sont *de novo*. L'incidence particulièrement élevée d'apparition de ces variations pourrait notamment être due à la grande taille du gène, ainsi qu'à l'existence de séquences répétées autour de *NF1* et de nombreux îlots CpG dans la séquence codante.

I.4.2.1. Variations du nombre de copies (CNV)

Dans 5 à 10 % des cas, la neurofibromatose de type 1 est due à une microdélétion qui englobe l'intégralité du gène *NF1* et un nombre variable de gènes adjacents (Kluwe et al.,

2004). Ces microdélétions résultent de la présence des pseudogènes ainsi que de 3 sites de recombinaisons homologues de type low copy repeat (LCR) appelés NF1-REP-a, NF1-REP-b et NF1-REP-c (Figure 8). Ces éléments, dont les séquences sont très proches les unes des autres, favorisent l'appariement des chromosomes homologues et la formation de crossing-over. Ils sont impliqués dans 90 % des microdélétions observées. La microdélétion de type 1 résulte d'une recombinaison homologue entre les sites NF1-REP-a et NF1-REP-c. Sa taille est d'environ 1,4 Mb et elle représente 77 % des microdélétions observées chez les patients atteints de NF1. La microdélétion de type 2 est due à une recombinaison homologue entre le gène *SUZ12* et son pseudogène *SUZ12P*. Sa taille est d'environ 1,2 Mb et représente 9 % des microdélétions de la région 17q11.2. La microdélétion de type 3 est le résultat d'une recombinaison entre les sites NF1-REP-b et NF1-REP-c. Sa taille est d'environ 1 Mb et elle représente 4 % des cas de microdélétions. Dans 10 % des cas, les microdélétions sont dites atypiques et impliquent des sites de cassures non récurrents. Les tailles de ces délétions varient entre 1 et 8 Mb (Abramowicz and Gos, 2014; Pasmant et al., 2010).

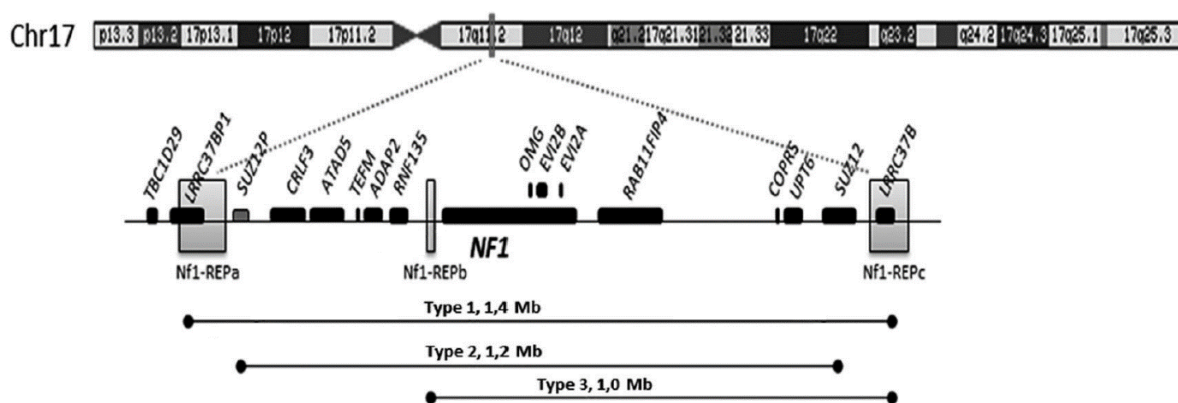


Figure 8 : Organisation génomique du locus de *NF1*

Représentation de la localisation du gène *NF1* sur le chromosome 17 (locus 17q11.2) et principales microdélétions observées dans la neurofibromatose de type 1 (Abramowicz and Gos, 2014).

I.4.2.2. Mutations ponctuelles

Il n'existe pas de « point chaud » de mutations pour le gène *NF1*. Les mutations se répartissent tout le long du gène mais semblent plus fréquentes dans les exons codant les régions GRD (Gap-related domain) et CSRD (Cystein and Serin rich domain) (Fahsold et al., 2000). Ces régions sont importantes pour la fonction de la neurofibromine et les mutations les affectant pourraient donc être plus fréquemment identifiées du fait de leur impact

phénotypique. Par exemple, des mutations du domaine GRD transforment la lysine 1423 en glutamine ou en glutamate dans les neurofibromes associés à la neurofibromatose de type 1, entraînant une inhibition de l'activité RasGAP de NF1 (Li et al., 1992; Upadhyaya et al., 1997) (partie 1.5.2.2.).

Tous les types de mutation ponctuelle ont été observés : mutations faux-sens, non-sens, mutations d'épissage, insertions ou délétions de quelques paires de bases. Dans 80 % des cas, la mutation conduit à la formation d'une protéine tronquée qui est rapidement dégradée. Dans les 20 % restant, la mutation induit un changement d'acide aminé qui altère l'activité de la protéine (Abramowicz and Gos, 2014). Le phénotype observé est donc essentiellement la conséquence d'une perte de fonction de la protéine.

I.4.3. Corrélation génotype/phénotype

Le spectre des mutations de *NF1* est très large et, à ce jour, peu de corrélations ont été établies entre le génotype et le phénotype. Une seule mutation du gène *NF1* a été spécifiquement associée à certains symptômes. Il s'agit d'une délétion de 3 nucléotides dans l'exon 17 (c.2970-2972 delAAT) caractérisée chez les patients par des défauts de pigmentation et la présence de nodules de Lisch mais aucun neurofibrome, ni cutané, ni plexiforme (Upadhyaya et al., 2007).

Les formes les plus sévères de la pathologie sont observées lorsque le gène entier est délété, *a fortiori* lorsque la délétion inclut également des gènes adjacents à *NF1*. Les effets d'une haploinsuffisance de ces gènes peuvent alors s'ajouter à celle d'une délétion de *NF1*. Il s'agit d'un syndrome micro-délétionnel qui est associé chez les patients à une fréquence plus élevée de dysmorphies faciales, d'une apparition plus précoce de neurofibromes, de troubles de l'apprentissage et d'anomalies cardiovasculaires (Castle et al., 2003; Mautner et al., 2010; Pasmant et al., 2010; Venturin et al., 2004). La délétion du gène *OMG*, par exemple, a été impliquée dans les troubles d'apprentissage (Venturin et al., 2006) et dans l'autisme (Martin et al., 2007; Vourc'h et al., 2003). Le gène *RNF135*, parfois également délété dans la NF1, a été associé à l'autisme (Tastet et al., 2015). En revanche, le rôle des autres gènes potentiellement délétés n'est pas encore connu (Pasmant et al., 2010).

Les formes les moins graves de la pathologie peuvent s'observer dans les cas de mosaïcisme (Viskochil, 2002). Le mosaïcisme désigne la coexistence chez un même individu

de deux ou plusieurs populations de cellules possédant des génotypes différents. Elle est due à l'apparition d'une mutation au cours de l'embryogenèse. Dans la NF1, le mosaïcisme est responsable d'une forme dite « segmentaire » de la pathologie. Elle se catégorise alors en 3 groupes qui sont fonction du stade d'apparition de la mutation : les formes légères généralisées, les formes localisées et les formes gonadiques (Ruggieri and Huson, 2001; Williams et al., 2009).

I.4.4. Fonction du gène *NF1*

I.4.4.1. Un gène suppresseur de tumeur

Le gène *NF1* agit comme un suppresseur de tumeur en produisant la protéine NF1 qui inactive la voie Ras. Chez les patients atteints de neurofibromatose de type 1, une première copie du gène est constitutivement inactive. Les neurofibromes proviennent alors de cellules de Schwann qui ont subi une perte d'hétérozygotie suite à une mutation ou à une délétion de leur deuxième copie du gène, ce qui résulte en la perte totale de neurofibromine fonctionnelle et donc en une hyperactivation de la voie Ras (Basu et al., 1992; Colman et al., 1995; DeClue et al., 1992; Kim et al., 1995; Rutkowski et al., 2000; Serra et al., 2000; Sheela et al., 1990; Zhu et al., 2002). Les conséquences de cette hyperactivation sont décrites dans la partie 1.6.1. Le développement de tumeurs malignes nécessite quant à lui la survenue de mutations additionnelles dans d'autres gènes tels que *p53*, *CDKN2A* (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A) ou *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog) ou bien l'amplification des gènes du récepteur au PDGF (platelet-derived growth factor) ou à l'EGF (epidermal growth factor) (Castle et al., 2003; Zhu et al., 2002).

I.4.4.2. Un régulateur de différentes fonctions neuronales

Des troubles cognitifs sont observés chez environ 50 % des patients atteints de NF1, ce qui suggère un rôle du gène *NF1* dans le développement et le fonctionnement du système nerveux central. Les souris hétérozygotes *Nf1*^{+/-} présentent des troubles de la mémoire et de l'apprentissage dus à une haploinsuffisance de *NF1*. La protéine NF1 est engagée dans plusieurs voies de signalisation qui jouent un rôle dans la cognition et l'haploinsuffisance de NF1 dérégule ces voies (Costa et al., 2002; Cui et al., 2008; Li et al., 2005). Les conséquences de cette perte de régulation sont présentées dans la partie 1.6.2.

1.4.4.3. Un régulateur de la pigmentation de la peau, de la densité osseuse et de l'activation des macrophages

L'haploinsuffisance de *NF1* est responsable de nombreuses autres manifestations cliniques de la maladie : les TCL, les anomalies squelettiques et l'activation des macrophages. Elle peut induire une surexpression de gènes mélanogéniques dans les mélanocytes (Allouche et al., 2015; Diwakar et al., 2008). Au niveau des ostéoclastes, une haploinsuffisance de *NF1* peut favoriser une morphologie cellulaire aberrante et une augmentation des capacités de résorption (Alanne et al., 2012; Heervä et al., 2010). Enfin, l'haploinsuffisance de *NF1* peut entraîner une suractivation des macrophages dans la circulation sanguine, qui vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Cette sécrétion stimule la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires qui peut alors conduire à l'occlusion des vaisseaux (Lasater et al., 2010; Li et al., 2014; Stansfield et al., 2013).

1.5. La neurofibromine

1.5.1. Expression de la protéine

Les études d'expression sur *NF1* portent généralement sur des tissus de rat, sauf mention contraire. La protéine *NF1* est exprimée dans de nombreuses cellules, majoritairement au niveau cytoplasmique (DeClue et al., 1991). Elle est aussi associée au réticulum endoplasmique lisse des neurones du système nerveux central (Nordlund et al., 1993). Pendant la différenciation des cellules SH-SY5Y, une fraction de la protéine cytoplasmique est transportée dans le noyau (Leondaritis et al., 2009). La protéine a également été observée dans le noyau de cellules du cancer du sein, de cellules de Schwann normales et tumorales (Kweh et al., 2009). La localisation nucléaire pourrait être due à la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) codé par l'exon 43. Ce signal permet également l'adressage de la neurofibromine dans les vacuoles (Vandenbroucke et al., 2004).

NF1 est exprimée de manière accrue au niveau du cerveau, des reins et de la rate. Pour cette dernière, la protéine est principalement observée au niveau des lymphocytes B et T (Gutmann and Collins, 1993). Elle est également retrouvée au niveau des mélanocytes et des kératinocytes. L'expression de *NF1* dans le système nerveux a été montrée dans de nombreuses cellules neuronales, indépendamment de l'expression des neurotransmetteurs,

de la voie neuronale concernée ou de la région du cerveau. La protéine est également exprimée dans les oligodendrocytes et les neurones corticaux, pour le SNC, dans les cellules de Schwann non myélinisantes, les ganglions spinaux et les nerfs périphériques, pour le SNP (Daston et al., 1992).

L'expression de NF1 a aussi été étudiée au cours du développement. Aux 10^e et 12^e jours du développement embryonnaire, NF1 est exprimée dans tout l'embryon. A partir du 16^e jour, l'expression s'accroît au niveau des neurones corticaux, des ganglions périphériques et des faisceaux de nerfs périphériques. A partir du 6^e jour postnatal, l'expression décroît dans les tissus non neuronaux. Chez l'adulte, NF1 est faiblement exprimée dans les poumons, la peau et le cortex surrénalien, et absente des muscles squelettiques et du cartilage (Daston and Ratner, 1992).

L'expression de NF1 dépend également de l'isoforme considérée. Il existe 4 isoformes de NF1, dont l'expression a été montrée au niveau protéique. Les plus connues sont les isoformes I et II. L'isoforme I, dépourvue d'exon 23a, est exprimée majoritairement dans les neurones, et plus particulièrement dans le cortex cérébral, le cervelet, les cellules souches et les ganglions spinaux. L'isoforme de type II possède un exon 23a et est plutôt exprimée dans les cellules gliales, les cellules de Schwann et la glande surrénale.

I.5.2. Structure de la protéine

I.5.2.1. Structure globale

La neurofibromine est une protéine de 250 à 320 kDa, en fonction des isoformes. Elle se compose de plusieurs domaines : un domaine CSRD riche en cystéines et sérine, un domaine TBD de liaison à la tubuline, un domaine central GRD (GTPase activation protein Related Domain), un domaine SecPH (Sec14 homology, Pleckstrin homology), un domaine C-terminal CTD et un domaine SBD de liaison aux syndécanes (Figure 9). Les domaines GRD et SecPH sont les mieux décrits dans la littérature. Ce sont les seuls dont la structure tridimensionnelle ait été décrite (D'Angelo et al., 2006; Scheffzek et al., 1998; Trovó-Marqui and Tajara, 2006).

NF1 interagit avec un certain nombre de protéines et de lipides, qui la régulent ou lui permettent d'assurer ses fonctions. La plupart de ces interactions concernent des domaines

précis de la protéine. Pour d'autres, la cible n'est pas précisée ou concerne la protéine dans son ensemble. C'est le cas de l'interaction entre NF1 et la kinésine-1, la cavéoline-1, SPRED1 (Sprouty-related protein with an EVH domain 1), la LIM kinase 1 (LIMK1) et la culline-3.

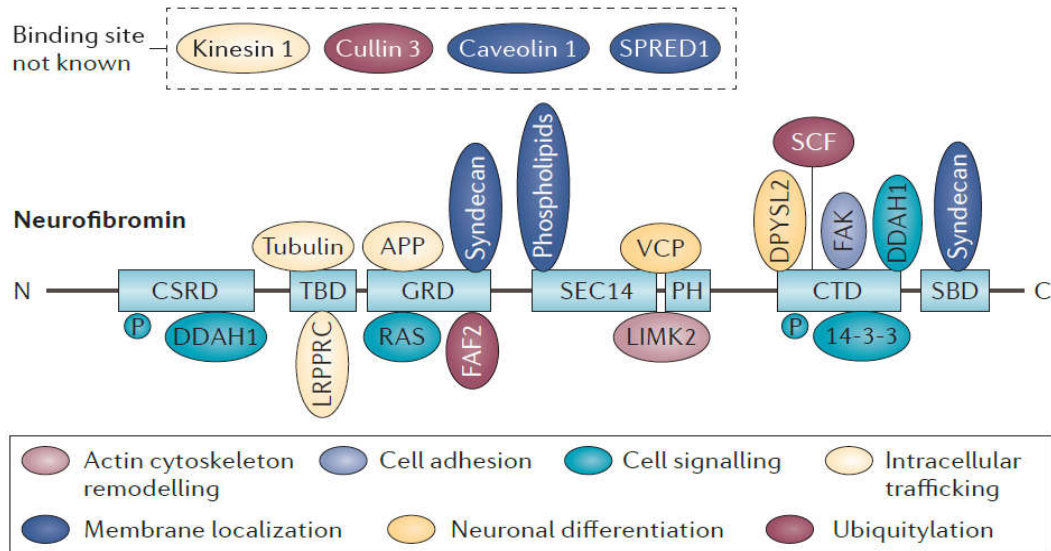


Figure 9 : Structure de la neurofibromine et protéines d'interaction

La neurofibromine contient plusieurs domaines (bleu clair) dont un domaine CSRD riche en cystéines et sérines, un domaine TBD de liaison à la tubuline, un domaine central GRD qui lui confère son activité RasGAP, un domaine Sec14 et un domaine PH de liaison aux phospholipides et aux protéines, un domaine CTD et un domaine SBD de liaison aux syndécans. Les protéines et les phospholipides qui interagissent avec NF1 sont associées aux fonctions qui leur sont attribuées : trafic intracellulaire (jaune clair), différenciation neuronale (jaune foncé), localisation membranaire (bleu foncé), remodelage du cytosquelette d'actine (rose clair), ubiquitinylation (rose foncé), adhésion cellulaire (violet) et signalisation cellulaire (turquoise). Chaque protéine est accolée au domaine avec lequel elle interagit. Les protéines dont le site de liaison est inconnu sont montrées à part. Les sites de phosphorylation de la protéine kinase A (PKA) sont également montrés (Ratner and Miller, 2015).

1.5.2.2. Domaine GRD

Le domaine GRD confère à NF1 sa fonction principale. Il correspond aux exons 21 à 27a (Barron and Lou, 2012) et aux acides aminés 1125 à 1537. Il s'agit d'une petite région localisée dans la partie centrale de la neurofibromine. Sa structure cristallographique a été décrite en 1998 par Scheffzek et collaborateurs (Figure 10). Son analyse révèle une structure hélicoïdale qui ressemble à un fragment dérivé de la protéine GAP-334. Le domaine GRD se compose de deux parties : une partie centrale (NF1c), qui possède tous les résidus spécifiques

des protéines RasGAP, et un domaine extra (NF1ex) (Scheffzek et al., 1998). Sa structure lui confère son activité RasGAP caractéristique (Figure 11) (Ballester et al., 1990; Martin et al., 1990; Xu et al., 1990).

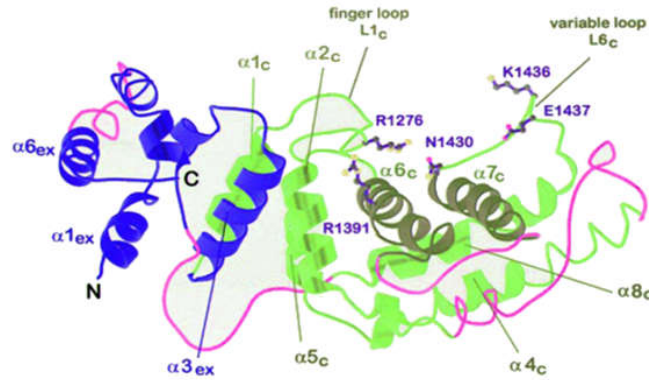


Figure 10 : Structure du domaine GRD de NF1

Représentation en ruban du domaine GRD de NF1. Le domaine central (NF1c) est représenté en vert et le domaine extra (NF1ex) en bleu. Les régions qui ne sont pas visibles sur ce modèle sont complétées par les segments correspondants dérivés du modèle GAP-334 et sont représentées en rose. Les hélices α_{6c} et α_{7c} forment le bas du sillon de liaison à la protéine Ras et apparaissent en vert foncé (Scheffzek et al., 1998).

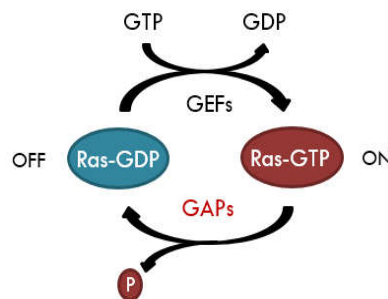


Figure 11 : Activité RasGAP

Les protéines RasGAP inactivent Ras en catalysant l'hydrolyse de Ras-GTP en Ras-GDP. Les facteurs d'échange (GEF) activent Ras en permettant l'échange de GDP avec le GTP.

Les protéines Ras sont ancrées dans la membrane plasmique par un groupement farnésyl et se lient aux nucléotides GDP et GTP. Liées au GTP, elles sont sous une forme active capable d'activer des voies de signalisation efférentes impliquées dans la prolifération cellulaire, telles que les voies MAPK et Pi3K. Elles peuvent passer à une forme inactive RasGDP en hydrolysant le GTP (Boguski and McCormick, 1993; Grand and Owen, 1991; Macara et al., 1996). Elles possèdent une activité GTPase intrinsèque faible, qui peut être augmentée 10^5 fois par les protéines RasGAP.

Les protéines de la famille des RasGAP fonctionnent en stimulant l'hydrolyse du GTP lié à p21^{ras} et en favorisant la forme inactive p21^{ras}-GDP, jouant ainsi un rôle de régulateur négatif de l'activité de Ras. A l'opposé, cette activité Ras est régulée positivement par les facteurs d'échange de nucléotides à guanine (GEF) qui échangent le GDP avec le GTP. Les protéines Ras ou p21^{ras} sont codées par les gènes *H-Ras*, *K-Ras* (oncogènes présents dans des virus provoquant les sarcomes murins de Harvey et Kirsten) et *N-Ras* (oncogène impliqué dans un neuroblastome humain). Elles ont une masse moléculaire de 21 kDa et sont impliquées dans la différenciation et la croissance cellulaire, par l'activation des voies MEK/MAPK et PI3K/Akt/mTor. Dans certains types cellulaires, les protéines Ras régulent également positivement la voie de l'adénylate cyclase (Figure 12).

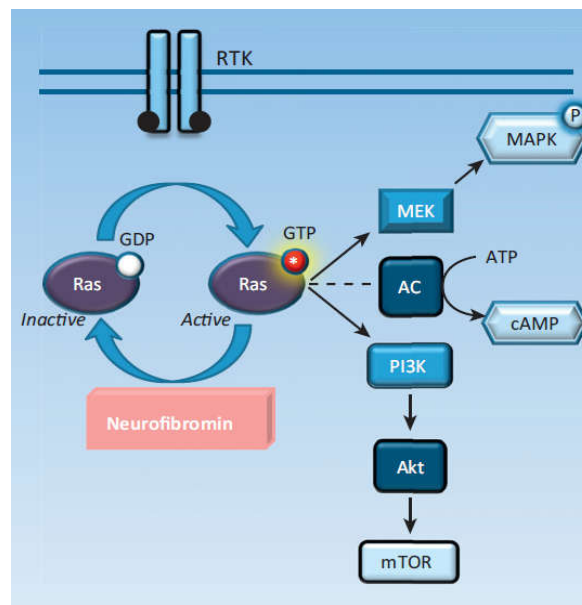


Figure 12 : Rôle de la neurofibromine sur la voie Ras

La neurofibromine régule négativement Ras en hydrolysant le GTP lié à la forme active de Ras. A l'inverse, l'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTK) permet l'échange de GDP en GTP et réactive Ras. L'activation de Ras stimule les voies MEK/MAPK, PI3K/Akt/mTor et de l'adénylate cyclase (Diggs-Andrews and Gutmann, 2013).

La fonction RasGAP de la neurofibromine lui est conférée par trois régions principales : la boucle du doigt d'arginine, la région FLR (phénylalanine-leucine-arginine) et la boucle variable $\alpha 7$. Le doigt d'arginine neutralise les charges négatives présentes sur le GTP durant le transfert du groupement phosphorylé. Ce rôle est crucial pour la stabilisation de l'état de transition de la réaction GTPase et il est contrôlé par des résidus proches de la boucle arginine qui déterminent spécifiquement l'orientation et le positionnement des doigts d'arginine dans

le site actif de Ras. La région FLR participe indirectement à la stimulation GTPase en stabilisant les régions variables de Ras. Enfin, la boucle variable $\alpha 7$ est formée de plusieurs acides aminés conservés, dont deux lysines impliquées dans de nombreuses interactions avec la région « switch I » de Ras. Cette boucle détermine la spécificité de l'interaction entre les protéines Ras et Ras-GAP (Ahmadian et al., 2003). L'isoforme I de NF1 possède une activité RasGAP 10 fois plus importante que l'isoforme II (Hinman et al., 2014; Yunoue et al., 2003), du fait de l'absence de la séquence codée par l'exon 23b, riche en résidus basiques qui modifient la structure de GRD et sa capacité à réguler Ras (Andersen et al., 1993; Uchida et al., 1992).

Par ailleurs, le domaine GRD interagit avec les protéines APP (Amyloid Precursor Protein), impliqué dans le transport des mélanosomes (De Schepper et al., 2006), et FAF2 (FAS-associated factor 2) (Ratner and Miller, 2015).

I.5.2.3. Domaine CSRD

Le domaine CSRD (Cystein-serin-rich domain) est situé dans la région N-terminale de la neurofibromine, entre les acides aminés 543 et 909. Il possède plusieurs cystéines pouvant constituer un domaine de liaison à l'ATP et il peut être phosphorylé par la protéine kinase A (PKA) (Izawa et al., 1996) et par la PKC (Mangoura et al., 2006), qui régulent l'activité ou la stabilité de la protéine. Il interagit avec la protéine DDAH (N^G , N^G -diméthylarginine diméthylaminohydrolase), qui agit sur la régulation de l'oxyde nitrique synthase (NOS) en association avec le domaine CTD (Tokuo et al., 2001).

I.5.2.4. Domaine TBD

Le domaine TBD (tubulin-binding domain) est situé en C-terminal du domaine CSRD et peut être assimilé à la partie N-terminale du domaine GRD. Il se caractérise notamment par son interaction avec la tubuline qui inhibe son activité RasGAP (Bollag et al., 1993). Le domaine TBD interagit également avec la protéine LRPPRC (Leucin-Rich Pentatricopeptide Repeat Motif-Containing Protein). L'association de NF1 et de LRPPRC serait un composant des particules de ribonucléoprotéines connues sous le nom de granules ARN, impliquées dans la synthèse de protéine de manière à la fois spatiale et temporelle (Arun et al., 2013).

I.5.2.5. Domaine SecPH

Le domaine SecPH est un fragment de 256 acides aminés situé en C-terminal du domaine GRD. Il facilite la liaison de la neurofibromine à la membrane et le trafic vésiculaire au niveau du système endomembranaire (Rad and Tee, 2016). Son rôle est moins bien connu que celui du domaine GRD, qu'il pourrait réguler par ses interactions. Chez la levure, par exemple, le domaine SecPH de la protéine IRA2, homologue de la neurofibromine, interagit avec la protéine TFS1, ce qui inhibe l'activité RasGAP d'IRA2 (Chautard et al., 2004).

C'est un domaine qui se compose de deux régions : une région Sec14, homologue au domaine Sec14p de la levure, et une région PH (Pleckstrin Homology). Les deux parties sont reliées par un peptide hélicoïdal $\alpha 7$.

La région Sec14 (résidus 1560 à 1698) présente un domaine de repliement α/β et un feuillet β central formant la base d'une cavité hydrophobe entourée d'hélices α (Figure 13A) (D'Angelo et al., 2006). Elle est retrouvée dans plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, telles que les RhoGEF, RhoGAP et RasGAP (Aravind et al., 1999; Phillips et al., 1999).

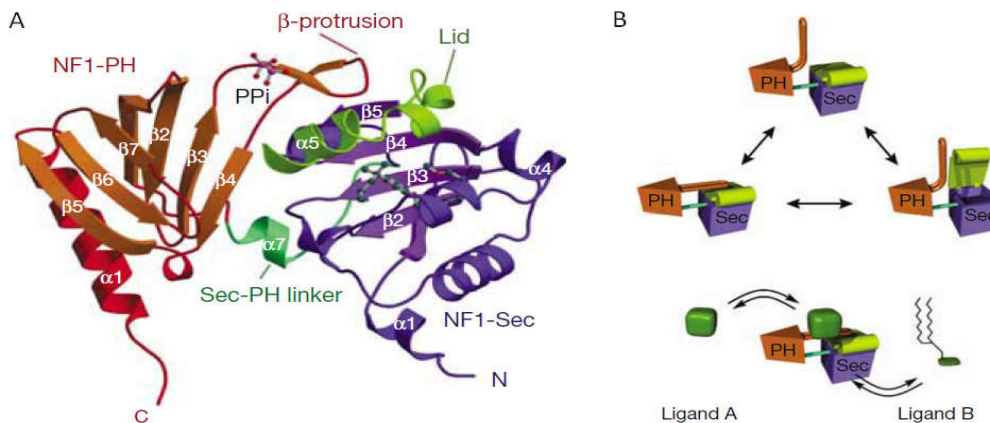


Figure 13 : Structure du domaine SecPH de NF1 (D'Angelo et al., 2006)

(A) Représentation en ruban du module SecPH de NF1, montrant l'architecture à deux domaines et (B) mécanisme hypothétique de changement de conformation dans le domaine PH permettant de réguler l'accès des ligands au domaine Sec.

La région PH présente un repliement en sandwich β , accolé à une hélice α en C-terminal. Une boucle, visible entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$, forme une petite protrusion β qui stabilise l'hélice $\alpha 5$ du domaine Sec (Figure 13A), jouant le rôle de couvercle au-dessus de la cavité formée par Sec et empêchant la fixation des ligands. L'ouverture de cette cavité

pourrait être induite par des changements conformationnels du domaine PH, suite à son interaction avec d'autres protéines (Figure 13B) (D'Angelo et al., 2006). La région PH est impliquée dans la fixation du phosphatidylinositol et le recrutement à la membrane (Mayer et al., 1993) ainsi que dans les interactions protéines-protéines (Lemmon, 2004).

La région Sec14 de NF1 est impliquée dans le transfert du phosphatidylinositol et de la phosphatidylcholine sur l'homologue de NF1 de la levure (Saito et al., 2007). Elle interagit également avec la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol (D'Angelo et al., 2006; Welti et al., 2007), ainsi qu'avec la protéine chaperone VCP (Valosin-Containing Protein) qui agit sur la formation des épines dendritiques (Wang et al., 2011). Enfin, le domaine SecPH interagit et régule négativement la protéine LIMK2, impliquée dans la dynamique de l'actine (Vallée et al., 2012). Le rôle de LIMK2 sera détaillé dans la partie II.

I.5.2.6. Domaine CTD

Le domaine CTD (Carboxy-terminal domain) est localisé en C-terminal du domaine SecPH. Il interagit avec la protéine DDAH en association avec le domaine CSRD. A l'instar du domaine CSRD, il peut également être phosphorylé par la PKA. Cette phosphorylation est requise pour l'interaction de NF1 avec la protéine 14-3-3, qui agit sur la régulation de la transduction du signal (Feng et al., 2004). Le domaine CTD interagit également avec la protéine CRMP-2 (Collapsin response mediator protein-2) ou DPYSL2 (Dihydropyrimidinase-like 2), impliquée dans la croissance des neurites et la guidance axonale (Lin and Hsueh, 2008; Patrakitkomjorn et al., 2008), et la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase), impliquée dans l'adhésion et la croissance cellulaire (Kweh et al., 2009).

I.5.2.7. Domaine SBD

Le domaine SBD (Syndecan-binding domain) est localisé dans la région C-terminale de NF1 et peut être assimilé à la partie C-terminale du domaine CTD. Il se caractérise par son interaction avec les syndécans (Hsueh et al., 2001), qui fonctionnent comme co-récepteurs dans les voies de signalisation de plusieurs récepteurs à tyrosine kinase. Elles sont impliquées dans l'adhésion de la matrice cellulaire, le mouvement cellulaire et la morphogénèse tissulaire (Perrimon and Bernfield, 2000; Schlessinger et al., 1995).

I.5.3. Régulation de la protéine

I.5.3.1. Phosphorylation

I.5.3.1.1. Phosphorylation par la PKA

La phosphorylation de NF1 par la PKA est régulée positivement par l'interaction entre la protéine DDAH et les domaines CSRD et CTD de NF1. Elle est requise pour l'interaction entre le domaine CTD et la protéine 14-3-3, impliquée dans la régulation de la transduction du signal (Tzivion and Avruch, 2002). Cette interaction régule négativement l'activité RasGAP de NF1. L'inhibition de l'activité de la PKA empêcherait donc l'interaction de 14-3-3 avec NF1, entraînant une activation de NF1 conduisant à une régulation négative de la voie Ras ainsi qu'à un arrêt du cycle cellulaire (Feng et al., 2004).

I.5.3.1.2. Phosphorylation par la PKC α

Dans les cellules neuronales, le domaine CSRD de la neurofibromine est phosphorylé par la PKC α suite à la stimulation des récepteurs à l'EGF. Cette phosphorylation entraîne d'une part une augmentation de l'activité RasGAP de NF1, et d'autre part une augmentation de l'association entre NF1 et les microfilaments d'actine (Mangoura et al., 2006). Une stimulation brève du récepteur à l'EGFR conduit à une augmentation de la prolifération des cellules tandis qu'une stimulation longue induit une différenciation cellulaire associée à une croissance des neurites (Marshall, 1995; Stork, 2002). Une stimulation longue serait donc nécessaire à la phosphorylation de NF1 par la PKC. Cela augmenterait l'inhibition de la prolifération cellulaire, entraînant l'activité RasGAP de NF1 et favoriserait la différenciation et la migration des cellules, grâce à l'interaction de la neurofibromine avec l'actine.

I.5.3.2. Ubiquitylation

Suite à l'activation de la PKC par des facteurs de croissance, la protéine culline-3 agit de manière synergique avec la protéine KBTBD7 (Kelch repeat and BTB domain-containing-7) pour réguler l'ubiquitylation de NF1 et sa dégradation par le protéasome. Une dégradation excessive de NF1 suite à son ubiquitylation a ainsi été impliquée dans la pathogenèse des glioblastomes (Hollstein and Cichowski, 2013; McGillicuddy et al., 2009). L'ubiquitylation comprend plusieurs étapes enzymatiques successives conduisant au couplage de l'ubiquitine

à une protéine cible qui est alors conduite vers le protéasome pour être dégradée. Il s'agit d'un mécanisme important pour réguler l'amplitude et la durée de l'activation de la voie Ras par NF1 (Cichowski et al., 2003).

I.6. Physiopathologie

I.6.1. Rôle de NF1 dans la tumorigenèse

I.6.1.1. Prolifération cellulaire

Par son activité inhibitrice de la voie Ras, NF1 est principalement connue pour son rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire. Une diminution ou une absence de NF1 favorise la forme active de p21^{ras}, ce qui entraîne une stimulation permanente des voies MEK/MAPK et PI3K/mTor et induit une prolifération cellulaire anormalement élevée (Figure 14). Il a été montré qu'une perte de NF1 était corrélée à un taux élevé de p21^{ras}-GTP dans différents types de tumeurs (Basu et al., 1992; Bollag et al., 1996; DeClue et al., 1992; Lau et al., 2000). Des cellules déficientes en NF1 issues de MPNST ont une activation continue de la voie mTOR, qui résulte également d'une suractivation de la voie Ras (Endo et al., 2013). De la même façon, une perte partielle ou totale de l'expression de NF1 dans les cellules souches neurales (NSC) conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire. De plus, les NSC dépourvues de NF1 présentent des anomalies de la différenciation et de la survie cellulaire par rapport aux NSC *Nf1*^{+/+} (Dasgupta and Gutmann, 2005). Ces données suggèrent que la diminution de NF1 dans les cellules souches pourrait avoir des conséquences importantes sur la prédisposition à la formation de gliomes.

Par ailleurs, NF1 agit sur la prolifération cellulaire par une autre voie, dépendante de l'ATP : la voie AMPc/PKA (Figure 14). Le rôle stimulateur de NF1 sur la production de l'AMPc a d'abord été montré chez la drosophile (Guo et al., 1997, 2000; The et al., 1997) puis chez les mammifères (Dasgupta et al., 2003; Tong et al., 2002). Dans le cerveau de drosophile, Hannan et collaborateurs ont montré que plusieurs voies de signalisation cellulaire impliquaient la production d'AMPc. Deux sont dépendantes de NF1 mais seule l'une d'entre elles est dépendante de Ras, indiquant une activité de NF1 indépendante de Ras sur la production d'AMP cyclique (Hannan et al., 2006). Le rôle de NF1 dans la cognition *via* la voie AMPc/PKA est bien documenté mais la voie AMPc/PKA est aussi impliquée dans la prolifération

cellulaire. En effet, une diminution du taux d'AMPc est suffisante pour induire la formation de gliomes chez des souris modèles pour la neurofibromatose (Warrington et al., 2010). Les mécanismes de développement des tumeurs *via* cette voie ne sont pas connus actuellement mais il est à noter que l'activation de la voie AMPc/PKA va induire la phosphorylation de NF1 par la PKA, favorisant ainsi l'interaction entre NF1 et la protéine 14-3-3. Cette interaction résulte en une inhibition de l'activité GAP de NF1 conduisant à une activation de la voie p21ras et de la prolifération cellulaire (Feng et al., 2004).

La fonction RasGAP de NF1 est également régulée par l'association entre NF1 et la cavéoline-1 ainsi que celle entre NF1 et la protéine SPRED1. La cavéoline-1 participe à la formation de vésicules appelées cavéoles. C'est un suppresseur de tumeur qui régule le transport de plusieurs molécules de signalisation, dont certaines protéines Ras (Chen et al., 2000; Song et al., 1996). Lorsque la formation de cavéoles est inhibée, la régulation des voies situées en aval de la voie Ras est perturbée. NF1 et la cavéoline-1 agiraient de manière coordonnée sur ces différentes voies afin de réguler négativement la croissance et la différenciation cellulaire (Boyanapalli et al., 2006). L'interaction entre NF1 et SPRED1, un autre régulateur négatif de la voie Ras, permet la localisation de NF1 à la membrane et, par conséquent, la régulation de la voie Ras par NF1 (Stowe et al., 2012).

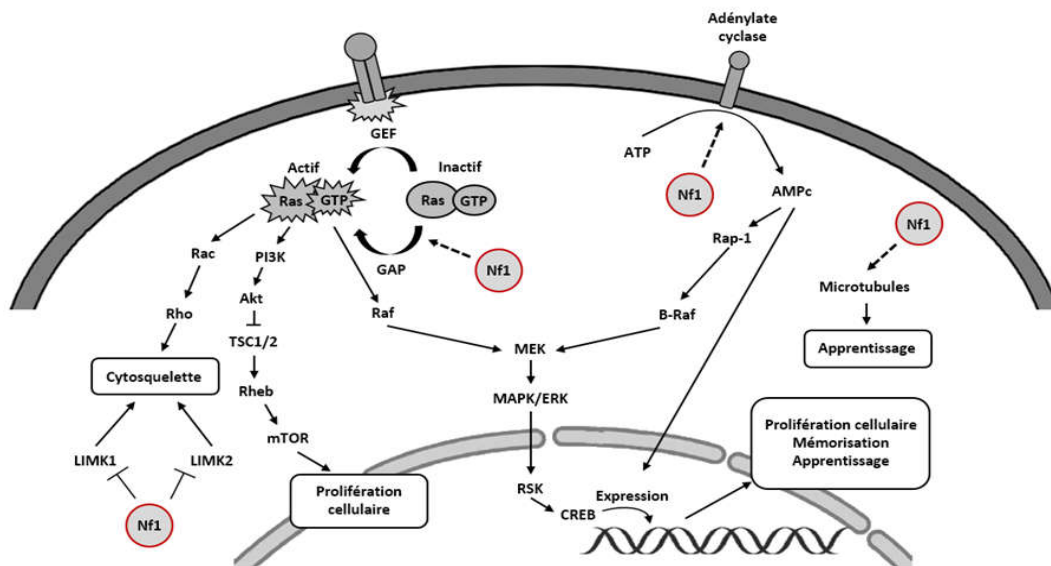


Figure 14 : Interactions entre NF1 et différentes voies de signalisation
 Les voies représentées incluent l'activation de Ras, la modulation de l'adénylate cyclase, l'association avec les microtubules et l'inhibition de la voie des LIM kinases (d'après Trovó-Marqui and Tajara, 2006).

I.6.1.2. Migration cellulaire

La phosphorylation de NF1 par la PKC α conduit à une augmentation de l'association entre NF1 et les filaments d'actine (Mangoura et al., 2006), dont la dynamique est impliquée dans la migration et la motilité cellulaire. Par l'intermédiaire de la voie Rho/ROCK/LIMK2/cofiline, NF1 régule la réorganisation du cytosquelette d'actine (Ozawa et al., 2005). En effet, la cofiline est un facteur de dépolymérisation de l'actine inactivé par les LIM kinases (Arber et al., 1998a). L'équipe du Dr. Bénédicti a montré que le domaine SecPH de NF1 empêchait la phosphorylation de LIMK2 par ROCK, inhibant l'action de LIMK2 sur la cofiline (Vallée et al., 2012). Par ailleurs, la région N-terminale de NF1 régule négativement la voie Rac1/Pak1/LIMK1 (Starinsky-Elbaz et al., 2009), entraînant ainsi l'inhibition des deux protéines de la famille des LIM kinases (Figure 14). La voie des LIM kinases, par son impact sur cette dynamique, peut être associée à la fois aux aspects tumoraux et cognitifs de la neurofibromatose de type 1 et sera détaillée dans la partie II de l'introduction.

NF1 est également impliquée dans les mécanismes d'adhérence cellulaire par son interaction avec la protéine FAK, localisée sur les sites de contact entre les cellules et la matrice extracellulaire, aussi appelés points de contacts focaux. Cette interaction permet à NF1 de réguler des mécanismes cellulaires tels que l'adhérence, la prolifération, la motilité, la migration et la survie cellulaire (Kweh et al., 2009).

I.6.2. Rôle de NF1 dans les troubles cognitifs

I.6.2.1. Prolifération des cellules souches neurales

Nous avons vu dans la partie 1.6.1.1 que NF1 régulait négativement la prolifération des cellules souches neurales (Dasgupta and Gutmann, 2005). De plus, les souris KO conditionnelles pour *Nf1* au niveau des neurones présentent un développement anormal du cortex cérébral associé à une augmentation de la densité cellulaire et de la prolifération des astrocytes (Zhu et al., 2001). NF1 a également été impliquée dans la formation de la barrière corticale dans le cortex somatosensoriel (Lush et al., 2008). La barrière corticale est formée par les neurones corticaux de la couche IV qui forment des anneaux en organisant leur corps cellulaire et leurs dendrites au travers des axones des neurones thalamiques. L'absence de

cette barrière conduit à un défaut de l'organisation neuronale dans le système nerveux central.

I.6.2.2. Migration neuronale

La neurofibromine n'a pas été directement impliquée dans la migration neuronale. Cependant, la régulation de la voie Ras a été impliquée dans ce processus. Ainsi, des souris déficientes en C3G, une protéine qui active la voie Ras, présentent un défaut de la migration des neurones corticaux (Voss et al., 2008). De plus, la neurofibromine interagit avec la protéine syndécan-3 (Hsueh et al., 2001), une héparine sulfate transmembranaire impliquée dans la migration des neurones (Hienola et al., 2006).

I.6.2.3. Croissance des neurites

La croissance des neurites est la première étape de la maturation des neurones, cruciale pour la mise en place du réseau neuronal (Figure 15). Les neurones *Nf1*^{+/-} présentent une diminution de 25 % de la longueur des neurites et de 40 % de la surface des cônes de croissance. Chez les souris *Nf1*^{+/-}, on observe également une augmentation de la prolifération des astrocytes et leur activation dans certaines zones du cerveau, entraînant la formation d'astroglie (Rizvi et al., 1999). Si les anomalies observées au niveau des astrocytes sont dues à une suractivation de la voie Ras, les anomalies neuronales, quant à elles, résulteraient d'un défaut de production d'AMPC intracellulaire (Brown et al., 2010a; Hegedus et al., 2007). Ainsi, ce défaut peut être corrigé par des traitements qui augmentent le taux d'AMPC intracellulaire, tels que le Rolipram ou des activateurs de l'adénylate cyclase. De même, une inhibition de la production d'AMPC dans des neurones *Nf1*^{+/-} entraîne une diminution de la croissance des neurites (Brown et al., 2010a, 2012). Toutefois, la voie Ras pourrait également être impliquée dans la différenciation des neurones puisque l'inhibition de l'activité RasGAP de NF1 inhibe la croissance des neurites (Yunoue et al., 2003). Le mécanisme moléculaire impliquant la voie Ras dans la production d'AMPC a été identifié récemment : Ras agirait en activant la PKC ζ , qui inhiberait l'activation de l'adénylate cyclase et donc la formation d'AMPC (Anastasaki and Gutmann, 2014). La voie de signalisation cellulaire connectant l'AMPC ainsi formée à la croissance des neurites a été identifiée. Il s'agit de la voie de signalisation Rho/ROCK/MLC qui passe par l'activation de la PKA par l'AMPC et qui régule la dynamique du cytosquelette d'actine (Brown et al., 2012). Il est intéressant de noter que LIMK2, dont le rôle

dans la croissance des neurites a été montré (Endo et al., 2007), pourrait aussi être impliquée dans ces processus régulés par NF1.

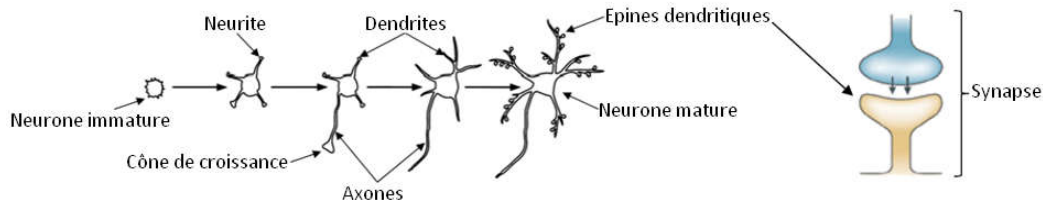


Figure 15 : Schéma des différentes étapes du neurodéveloppement (Govek et al., 2005).

Enfin, l'interaction entre NF1 et CRMP-2 (Patrakitkomjorn et al., 2008) agit également sur cette différenciation. L'interaction entraînerait une régulation de l'activation de CRMP-2 en empêchant sa phosphorylation et donc son inactivation par les protéines Rho kinase, CDK5 et GSK-3 (Fukata et al., 2002; Uchida et al., 2005). L'absence de NF1 conduirait à une inactivation de CRMP-2 et, par conséquent, à une inhibition de la croissance des neurites (Patrakitkomjorn et al., 2008; Rogemond et al., 2008). Par la cofiline, LIMK2 et la voie Rac1/PAK1/LIMK1 sont aussi impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine et il a été montré qu'elles jouaient un rôle dans la croissance des neurites (Endo et al., 2007). Elles pourraient ainsi être impliquées dans le rôle joué par NF1 dans la croissance des neurites.

I.6.2.4. Plasticité synaptique

Au cours du développement neuronal, les neurones développent des dendrites et des axones qui se connectent à leurs cibles pour former des synapses, composées d'une partie pré-synaptique et d'une partie post-synaptique, correspondant aux épines dendritiques (Figure 15). Ces connections restent dynamiques tout le long de la vie. Elles disparaissent ou se complexifient, dans un processus appelé plasticité synaptique.

NF1 interagit avec la syndécane-2, dont l'expression au cours de la synaptogenèse induit la maturation des épines dendritiques (Ethell and Yamaguchi, 1999). Cette interaction est indispensable à l'activation de la PKA par la syndécane-2, qui permettrait à la PKA de phosphoryler les protéines Ena/VASP, impliquées dans la polymérisation de l'actine et la formation des filopodes aboutissant à la formation des épines dendritiques. Cependant, bien que l'activation de la PKA soit essentielle à la formation des épines dendritiques, elle n'est pas suffisante, probablement du fait de l'implication de NF1 dans de multiples voies de

Introduction – La neurofibromatose de type 1

signalisation liées à la synaptogenèse (Lin et al., 2007). D'autre part, la neurofibromine et les syndécans se retrouvent au niveau de la région post-synaptique, suggérant un rôle potentiel de NF1 dans l'adhésion et la signalisation au niveau des synapses (Hsueh et al., 1998, 2001).

L'interaction entre NF1 et la protéine chaperonne VCP serait également impliquée dans la synaptogenèse. En effet, une perturbation de cette interaction conduit à une diminution de la densité des épines dendritiques chez la souris (Wang et al., 2011). Ces anomalies de la synaptogenèse, associées à une croissance anormale des neurites, pourraient conduire à une efficacité synaptique altérée et participer à l'apparition de troubles cognitifs chez les patients atteints de NF1.

Par ailleurs, la neurofibromine interagit avec la kinésine-1 qui est impliquée dans le transport de protéines et d'ARNm vers certaines destinations cellulaires spécifiques d'une manière dépendante de l'ATP et des microtubules (Brendza et al., 2000; Hirokawa, 1998). Cette interaction suggère une implication de NF1 dans la transduction du signal associée aux microtubules. Ce rôle de NF1 pourrait également expliquer les troubles cognitifs observés dans la neurofibromatose de type 1. En effet, un trafic aberrant de vésicules contenant des neurotransmetteurs dû à une protéine NF1 non fonctionnelle pourrait affecter le développement et le fonctionnement normal du cortex cérébral (Hakimi et al., 2002).

Chez la drosophile, des mutations dans le domaine GAP de NF1 provoquent des troubles de la mémoire à long terme tandis que des mutations dans la région C-terminale agissent sur la mémoire immédiate et l'apprentissage en passant par l'activation de l'AMPC (Ho et al., 2007), impliquant à la fois la voie Ras et la voie de l'AMPC dans les troubles cognitifs associés à NF1. Les souris *Nf1^{+/-}* présentent des troubles de l'apprentissage spatial (Costa et al., 2002; Silva et al., 1997). Ces troubles sont associés à une diminution de la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe. Plus précisément, ces troubles de la LTP concernent à la fois la phase précoce et la phase longue de la LTP (Costa et al., 2002; Guilding et al., 2007). La première est impliquée dans l'apprentissage et la mémoire immédiate tandis que la seconde régule la formation de la mémoire à long terme (Ho et al., 2007). Les deux pourraient donc contribuer aux troubles de la mémoire et de l'apprentissage chez les souris *Nf1^{+/-}*. Ces troubles peuvent être améliorés par des manipulations génétiques ou des traitements pharmacologiques mimant l'inhibition de la voie Ras (Costa et al., 2002; Li et al., 2005),

confirmant ainsi le rôle de cette voie et, par conséquent, de sa régulation par NF1, dans les troubles cognitifs associés à la neurofibromatose.

Une cible moléculaire à l'origine des rôles de la voie Ras dans la LTP a été identifiée : il s'agit de la phosphorylation de la synapsine-1 par Ras et la voie MAPK. Une fois phosphorylée, la synapsine-1 augmente le relargage du neurotransmetteur inhibiteur GABA au niveau des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe. L'augmentation de l'inhibition due à GABA serait la cause des troubles de la LTP chez les souris *Nf1*^{+/-}. De fait, le traitement de ces souris par des antagonistes du récepteur GABA_A restaure une LTP normale dans l'hippocampe (Costa et al., 2002; Cui et al., 2008)

Enfin, des souris *Nf1*^{+/-}, chez lesquelles l'expression de *Nf1* a été totalement inhibée dans les cellules gliales, présentent des troubles de l'attention qui seraient provoqués par une diminution du taux de dopamine dans le striatum, elle-même due à une baisse de l'expression de la tyrosine hydroxylase, enzyme permettant la synthèse du précurseur de la dopamine à partir de la tyrosine (Brown et al., 2010b). Il est intéressant de noter que l'utilisation de méthylphénidate, un traitement contre les TDAH inhibant la recapture de la dopamine, est efficace pour traiter les troubles de l'attention chez les patients atteints de neurofibromatose de type 1 (Mautner et al., 2002). Cependant, le mécanisme moléculaire reliant NF1 à la production de dopamine est inconnu à ce jour.

II. Les LIM kinases

II.1. Aspects génétiques

II.1.1. Organisation génomique

La famille des LIM kinases (LIMK) comprend deux membres : LIMK1 et LIMK2. Les protéines sont codées chez l'homme par deux gènes distincts localisés en 7q11.23 et 22q12.2, respectivement. *LIMK1* s'étend sur 39,5 kb avec 17 exons et *LIMK2* est long de 68,6 kb pour 18 exons (Figure 16). Le plus ancien groupe eucaryote possédant à la fois *LIMK1* et *LIMK2* dans son génome correspond à celui des poissons, ce qui signifie que la duplication du gène ancestral *LIMK* s'est produite au plus tard il y a environ 455 millions d'années, suite à l'apparition des téléostomiens. Ce clade inclut notamment les actinoptérygiens, lesquels regroupent la quasi-totalité des poissons communs. L'organisme le plus proche des téléostomiens dont le génome a pu être séquencé est *Ciona intestinalis*, une espèce de l'embranchement des urochordés, qui ne possède qu'un gène *LIMK* (Te Velthuis et al., 2007). Les urochordés sont apparus il y a environ 550 millions d'années, ce qui situe la duplication du gène *LIMK* entre 455 et 550 millions d'années.

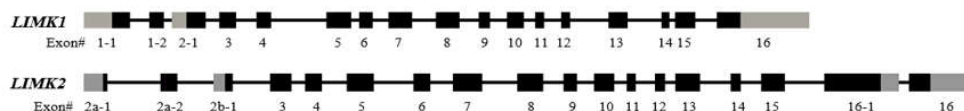


Figure 16 : Organisation génomique de *LIMK1* et de *LIMK2* chez *Homo sapiens*. *LIMK1* et *LIMK2* possèdent 17 exons et 18 exons, respectivement.

II.1.2. Isoformes

Les ARN pré-messagers de LIMK1 et de LIMK2 font tous les deux l'objet d'épissages alternatifs qui permettent la formation de plusieurs protéines ou isoformes à partir d'une seule séquence génomique. Les isoformes présentées dans ce chapitre sont celles retrouvées chez l'homme.

L'épissage alternatif de *LIMK1* résulte en la formation de deux ARNm (Figure 17). LIMK1-1 (GenBank NM_002314) est considérée comme la séquence canonique, qui

correspond généralement à la séquence la plus longue et la plus étudiée. LIMK1-1 s'étend sur 3398 nucléotides avec 16 exons et LIMK1-2 (GenBank NM_001204426) s'étend sur 3176 nucléotides pour 15 exons incluant un premier exon alternatif (2-1) qui remplace les exons 1-1 et 1-2 de LIMK1-1. La littérature ne fournit pas davantage de données concernant les régions promotrices de ces deux isoformes et leurs rôles respectifs.

Les transcrits de *LIMK2* sont au nombre de 3 chez l'homme (Figure 17B). LIMK2-2a (GenBank NM_005569) est considérée comme la séquence canonique. Nous noterons qu'il ne s'agit pas dans ce cas de la séquence la plus longue. Elle reste néanmoins la plus étudiée. L'ARNm s'étend sur 3701 nucléotides avec 16 exons tandis que LIMK2-2b (GenBank NM_016733) s'étend sur 3848 nucléotides pour 15 exons. Ce dernier possède un exon alternatif (2b-1) qui remplace les exons 2a-1 et 2a-2 de LIMK2-2a. Enfin, LIMK2-1 (GenBank NM_001031801) est la troisième isoforme observée chez l'homme. Elle a été identifiée plus tardivement que les deux autres et n'avait été mentionnée qu'une seule fois dans la littérature au début de ce travail (Croft et al., 2011). C'est la seule à être spécifique des primates (Tastet, 2012) tandis que LIMK2-2a et LIMK2-2b sont conservées au cours de l'évolution. Il s'agit également de l'isoforme la plus longue, avec un ARNm de 2914 nucléotides et 15 exons. Les exons 2b-1 à 15 sont identiques à ceux de LIMK2-2b. Le seizième exon diffère de ceux de LIMK2-2a et LIMK2-2b.

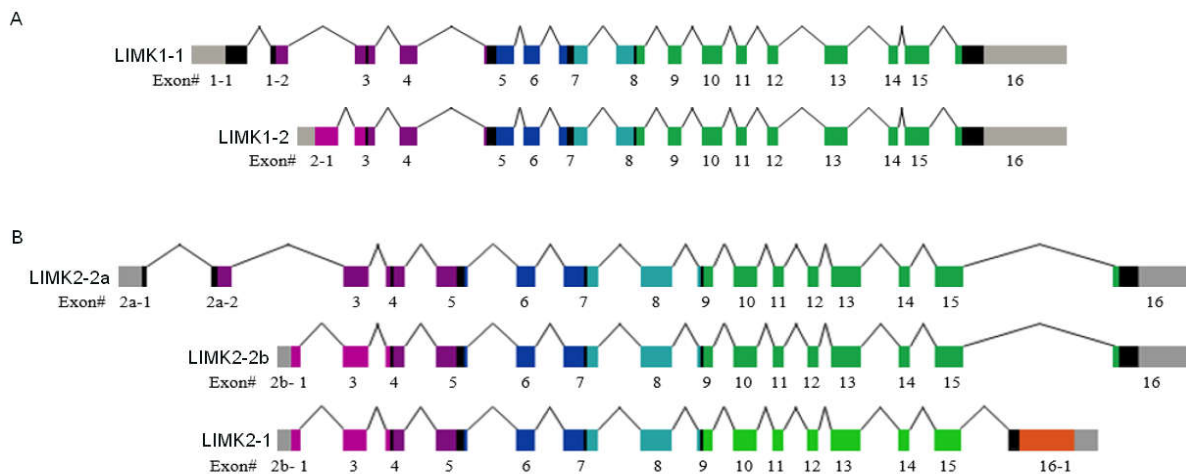


Figure 17 : Schéma montrant les différents transcrits de LIMK1 et LIMK2. Les couleurs correspondent aux différents domaines de la protéine codés par ces séquences. Le rose et le violet sont pour les domaines LIM' et LIM, respectivement, le bleu est pour le domaine PDZ, le bleu clair pour le domaine S/P, le vert pour le domaine kinase (vert foncé pour les isoformes de LIMK1, pour LIMK2-2a et pour LIMK2-2b, vert clair pour LIMK2-1) et l'orange pour le domaine PP1i.

II.2. Expression des LIM kinases

Sauf mention contraire, les études d'expression ont été menées chez la souris et chez le rat et les isoformes étudiées sont les plus longues existant chez ces espèces, i.e. LIMK1-1 et LIMK2-2a.

L'expression des ARNm de LIMK1 et de LIMK2 a été étudiée par hybridation *in situ* et Northern blot. Ces études rapportent une expression ubiquiste de chacun des deux ARNm (Koshimizu et al., 1997; Mizuno et al., 1994; Nunoue et al., 1995). Au niveau du système nerveux central, de la moitié à la fin de la gestation, les deux sont fortement exprimés et pourraient être redondants. Chez la souris adulte, les ARNm de LIMK1 et de LIMK2 sont exprimés à la fois dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe, bien que celui de LIMK1 soit plus exprimé dans le cortex que celui de LIMK2. L'ARNm de LIMK1 apparaît également dans les noyaux profonds du cervelet, les noyaux des nerfs faciaux et hypoglosses. L'ARNm de LIMK2 est exprimé préférentiellement au niveau des glandes sous-maxillaires et de l'épithélium olfactif (Mori et al., 1997; Pröschel et al., 1995).

Pour compléter ces études sur l'ARNm, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques a permis de caractériser l'expression de LIMK1 et de LIMK2 au niveau protéique, par Western blot et immunocytochimie. Les anticorps utilisés reconnaissant une région commune aux différentes isoformes, les travaux présentés ci-après ne les distinguent donc pas. LIMK1 est largement exprimée dans les tissus embryonnaires et adultes, avec une expression élevée dans le cerveau, les reins, les poumons, l'estomac et les testicules (Foletta et al., 2004). LIMK2 apparaît dans la majorité des tissus étudiés, embryonnaires et adultes, à l'exception des cellules gliales, des glomérules rénaux et des spermatozoïdes (Acevedo et al., 2006). Au niveau du système nerveux central, LIMK1 est exprimée dans les cônes de croissance des neurones spinaux de poulet (Endo et al., 2003) ainsi que dans les axones et cônes de croissance des neurones pyramidaux d'hippocampe de rat (Foletta et al., 2004). LIMK2 apparaît au niveau des neurones, des cellules épendymaires et des cellules de Purkinje. Elle a également été détectée au niveau des cellules de l'éminence ganglionnaire médiane (Andrews et al., 2013), une structure transitoire impliquée dans la migration des cellules neuronales vers le néocortex (Brazel et al., 2003). Ces profils d'expression suggèrent un rôle de ces protéines dans le fonctionnement du système nerveux central, détaillé dans la revue « Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction » (partie II.4.2.).

Aucune distinction n'est faite entre l'expression de LIMK1-1 et celle de LIMK1-2. En revanche, une étude montre une différence d'expression entre LIMK2-2a et LIMK2-2b. LIMK2-2a est prédominante au niveau du foie, du colon et de l'estomac, tandis que LIMK2-2b est plus abondante dans le cerveau, les reins et le placenta. Au niveau des poumons, l'expression des deux isoformes est équivalente. Ces différences d'expression peuvent s'expliquer par des régions promotrices différentes. Les deux promoteurs sont dépourvus de boîtes TATA. L'expression de LIMK2-2a serait régulée positivement par le facteur de transcription MZF-1 tandis que l'expression de LIMK2-2b serait régulée négativement par MZF-1 et positivement par ROR α 1 (Nomoto et al., 1999). Des études sont requises pour comprendre l'implication de chacun de ces facteurs de transcription sur l'expression de LIMK2-2a et de LIMK2-2b. D'autre part, p53 active l'expression des ARNm de LIMK2-2b et de LIMK2-1 mais pas celui de LIMK2-2a (Croft et al., 2011). LIMK2-2b et LIMK2-1 ayant exactement la même séquence transcrite puis traduite en 5', nous pouvons supposer qu'elles possèdent le même promoteur. Cette hypothèse reste néanmoins à vérifier.

Enfin, la localisation subcellulaire de LIMK1 et de LIMK2 présente également quelques différences. Dans les fibroblastes NIH3T3, les cellules HeLa et les cellules olfactives épithéliales, LIMK2 apparaît essentiellement dans le cytoplasme (Acevedo et al., 2006) tandis que LIMK1 est retrouvée principalement au niveau des points focaux d'adhésion et autour du noyau dans les cellules NIH3T3 (Foletta et al., 2004). Leur localisation diffère également au cours du cycle cellulaire. LIMK1 est observée au niveau du contact entre les cellules pendant l'interphase et au niveau des centrosomes, aux extrémités du fuseau mitotique et dans l'anneau de clivage au cours de la mitose. LIMK2 est localisée dans toute la cellule pendant l'interphase et se retrouve au centre du fuseau mitotique et au niveau de l'anneau de clivage pendant la mitose (Sumi et al., 2006). Enfin, l'expression peut différer en fonction des isoformes : LIMK2-2a est exprimée dans le cytoplasme et dans le noyau tandis que LIMK2-2b a une expression majoritairement cytoplasmique dans les cellules Cos de singe vert (Osada et al., 1996).

II.3. Les LIM kinases

II.3.1. Structure des protéines

Les séquences canoniques de chacune des LIMK comportent deux domaines LIM en N-terminal, nommés d'après l'acronyme de trois facteurs de transcription (Lin11, Isl1 et Mec-3), un domaine PDZ (PSD-95, DigA, ZO-1), un domaine S/P riche en sérines et prolines, et un domaine kinase en C-terminal. L'isoforme LIMK2-1 comporte un domaine supplémentaire inhibiteur de la phosphatase 1 (PP1i) en C-terminal du domaine kinase, ainsi qu'un domaine kinase tronqué de quelques acides aminés. Les protéines LIMK1 et LIMK2 sont identiques à 50 %, avec 50 % d'identité pour les domaines LIM d'une protéine à l'autre et 20 % d'un domaine LIM à l'autre au sein d'une même protéine. Les domaines PDZ et kinases présentent 45 et 70 % d'identité, respectivement. La structure tridimensionnelle a été déterminée pour le second domaine LIM (PDB : 1X6A), pour le domaine PDZ de LIMK2 (PDB : 2YUB) et pour les domaines kinases de LIMK1 (PDB : 3S95) et LIMK2 (PDB : 4YPT) (Goodwin et al., 2015).

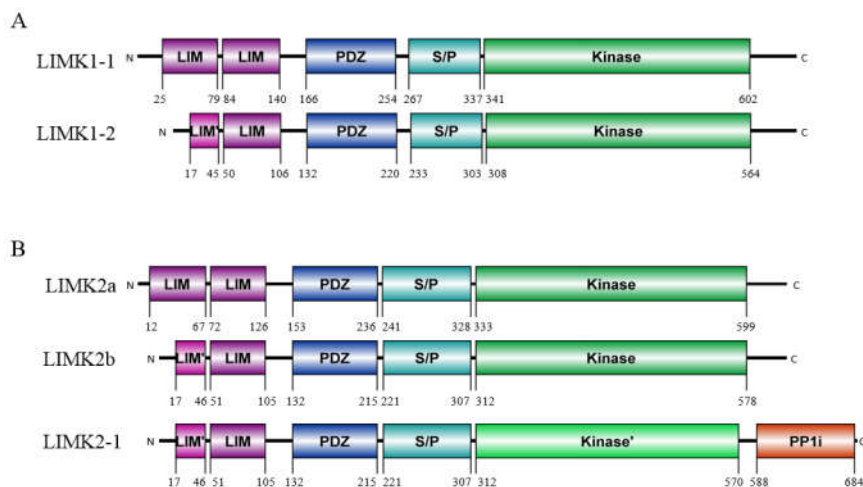


Figure 18 : Schéma montrant l'organisation protéique des LIM kinases. Les couleurs correspondent aux différents domaines de la protéine. Le rose et le violet sont pour les domaines LIM' et LIM, respectivement, le bleu est pour le domaine PDZ, le bleu clair pour le domaine S/P, le vert pour le domaine kinase (vert foncé pour les isoformes de LIMK1, pour LIMK2-2a et pour LIMK2-2b, vert clair pour LIMK2-1) et l'orange pour le domaine PP1i.

A ce jour, deux isoformes de LIMK1 et trois isoformes de LIMK2 apparaissent dans les bases de données chez l'homme (Figure 18) et correspondent aux ARNm déjà décrits (partie II.1.2.). LIMK1-1 et LIMK1-2 se composent de 647 et de 613 acides aminés, respectivement. LIMK1-2 possède un domaine LIM tronqué à son extrémité N-terminale. LIMK2-2a comprend

638 acides aminés tandis que LIMK2-2b est composée de 617 acides aminés et possède un domaine LIM tronqué en N-terminal. L'isoforme LIMK2-1 est une protéine de 686 acides aminés identique à LIMK2-2b en N-terminal et possédant un domaine PP1i putatif en C-terminal. Le domaine PP1i remplace les derniers acides aminés du domaine kinase présents sur LIMK2-2a et LIMK2-2b. L'impact de cette délétion sur l'activité kinase de LIMK2-1 et le rôle de ce domaine PP1i ont été étudiés au cours de cette thèse.

Les domaines LIM contiennent chacun deux motifs en doigts de zinc. Ils régulent négativement l'activité du domaine kinase en interagissant avec lui (Nagata et al., 1999; Tomiyoshi et al., 2004) et contribuent à la formation d'homodimères et d'hétérodimères LIMK1/LIMK2 positionnés tête-bêche (Hiraoka et al., 1996). Nishiya et collaborateurs (1998) ont montré que les domaines LIM de HIC-5 (Hydrogen peroxide-inducible clone-5) étaient capables d'interagir avec des fragments d'ADN spécifiques, bien que cela n'ait pas été confirmé *in vivo* (Nishiya et al., 1998). De plus, à ce jour, cette interaction n'a pas été montrée pour les protéines LIMK. Le domaine PDZ est également un domaine d'interaction protéines-protéines. De plus, il influence la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à deux signaux d'export nucléaire riches en leucines (Yang and Mizuno, 1999; Yang et al., 1998a). La translocation vers le noyau est conduite par deux signaux de localisation nucléaire. L'un est situé entre les domaines PDZ et kinase de LIMK1 et de LIMK2 tandis qu'un autre n'est présent que dans le domaine kinase de LIMK2 (Goyal et al., 2006). Le domaine kinase des LIMK leur confère leur activité spécifique de sérine/thréonine kinases, qui leur permet notamment de phosphoryler et, ainsi, d'inactiver la cofiline (Arber et al., 1998a; Maekawa et al., 1999). Enfin, le domaine PP1i de l'isoforme LIMK2-1 est supposé inhiber la phosphatase 1.

II.3.2. Régulation des protéines

II.3.2.1. Activation

II.3.2.1.1. La voie des Rho GTPases

LIMK1 et LIMK2 sont principalement activées par les protéines de la voie des Rho GTPases (Figure 19 et Figure 20), qui conduisent à la phosphorylation de leur thréonine 508 et 505, respectivement (Amano et al., 2001; Edwards and Gill, 1999; Sumi et al., 2001a), localisées dans la boucle d'activation de leur domaine kinase.

Introduction – Les LIM kinases

Les protéines G de la famille Rho les plus étudiées sont Rac1, Cdc42 et RhoA. Elles agissent comme des interrupteurs moléculaires et, à ce titre, peuvent être activées par les protéines RhoGEF et inactivées par les protéines RhoGAP, analogues de la protéine RasGAP neurofibromine. Ce passage d'une forme activée à une forme inactivée, et réciproquement, contrôle de nombreuses fonctions cellulaires, qui incluent l'assemblage des filaments d'actine et la réorganisation du cytosquelette, mais aussi la régulation de la transcription, du cycle cellulaire, de la dynamique des microtubules, du transport vésiculaire et de nombreuses activités enzymatiques. Les protéines Rac1, Cdc42 et RhoA activent notamment les protéines PAK (p21 protein-activated kinase), MRCK α (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase) et ROCK (Rho-associated protein kinase) dans la voie conduisant à l'activation des LIMK.

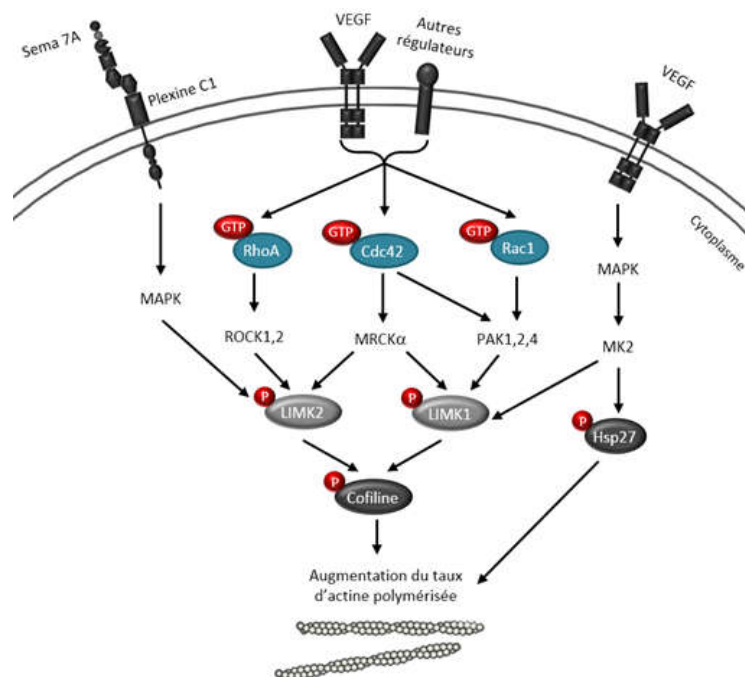


Figure 19 : Régulation des LIM kinases par les voies des RhoGTPases et la voie MAPK
LIMK1 est phosphorylée par les voies Cdc42/MRCK α , Rac1/PAK1,2,4, et VEGF/MAPK/MK2. LIMK2 est phosphorylée par la voie RhoA/ROCK 1,2 et Cdc42/MRCK α ainsi que par MAPK suite à son activation par la formation du complexe Plexine C1 – Sémaphorine 7A (d'après Manetti, 2012).

Les membres de la famille PAK sont connus pour leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine. PAK1, PAK2 et PAK4 phosphorylent préférentiellement LIMK1 en aval de Rac1 et de Cdc42 (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999; Misra et al., 2005; Wu et al., 2003). Cette voie semble impliquée dans la tumorigénèse. En effet, l'interaction entre PAK4 et LIMK1

favorise la migration des cellules cancéreuses dans le cancer de la prostate après stimulation par HGF (Hepatocyte growth factor) (Ahmed et al., 2008) et dans les cancers gastriques humains par l'intermédiaire de la protéine DGCR6L (DiGeorge syndrome critical region gene 6-like) (Li et al., 2010). La voie Rac1/PAK est régulée par MOCA (Modifier of cell adhesion), un facteur d'échange de nucléotide guanine spécifique des protéines Rho (RhoGEF) et la perte de MOCA induit une dérégulation de la polymérisation de l'actine (Chen et al., 2009).

Les protéines ROCK sont des sérines/thréonines kinases impliquées dans de nombreux aspects de la motilité cellulaire, de la contraction des muscles lisses à la migration en passant par la croissance des neurites. La voie Rho/ROCK1 et 2 active préférentiellement LIMK2 (Amano et al., 2001; Sumi et al., 2001a), bien que, lorsqu'elle est suractivée, ROCK soit également capable de phosphoryler LIMK1 (Ohashi et al., 2000). La voie Rho/ROCK est régulée par le stress hyperosmotique qui induit une augmentation de la phosphorylation de la cofiline suivie d'une augmentation du taux d'actine polymérisée (Thirone et al., 2009). Elle est également activée au niveau des plaquettes suite à la stimulation par la thrombine (Pandey et al., 2006).

Enfin, la protéine MRCK α (Myotonic dystrophy kinase-related Cdc-42-binding kinase α), impliquée dans la réorganisation du cytosquelette (Leung et al., 1998) et la croissance des neurites (Chen et al., 1999) active à la fois LIMK1 et LIMK2 en aval de Cdc42 (Sumi et al., 1999, 2001b).

II.3.2.1.2. La voie MAPK

Dans les cellules endothéliales, la stimulation par VEGF (Vascular endothelial growth factor) est impliquée à la fois dans la dynamique de l'actine et dans la migration cellulaire. Il semble donc logique que cette stimulation participe à la régulation des LIMK. En réalité, elle agit de deux manières. D'une part, elle induit une activation de la protéine MAPK (p38-mitogen activated protein kinase) qui active à son tour la protéine MK2 ou MAPKAPK2 (MAPK-activated protein kinase 2). MK2 phosphoryle et inactive alors Hsp27 (Heat shock protein 27), une protéine de coiffe de l'actine, perturbant ainsi sa capacité à inhiber la polymérisation de l'actine (Guay et al., 1997; Landry and Huot, 1999; Rousseau et al., 1997). D'autre part, la protéine MK2 phosphoryle LIMK1 au niveau de sa sérine 323. La phosphorylation de cette sérine, localisée dans le domaine S/P, permet l'activation de LIMK1

indépendamment de la phosphorylation de la thréonine 508. L'effet observé reste toutefois similaire et conduit à une phosphorylation de la cofiline et une augmentation de la polymérisation de l'actine. Cette phosphorylation de la sérine 323 pourrait induire une modification de la structure tridimensionnelle de LIMK1, qui ne pourrait alors plus être inhibée par son domaine N-terminal (Kobayashi et al., 2006; Nagata et al., 1999) (Figure 19 et Figure 20). Par ailleurs, MAPK phosphoryle également LIMK1 sur sa sérine 310, sans que cela affecte l'activité de LIMK1.

La protéine MAPK peut également être activée par une interaction entre la plexine C1 et la sémaphorine 7A. Dans ce cas, c'est la protéine LIMK2 qui est phosphorylée et qui inactive la cofiline (Figure 19 et Figure 20). Ces résultats proposent une voie de signalisation spécifique de LIMK2 régulée par MAPK. Par ailleurs, la plexine C1 pourrait être un suppresseur de tumeur dans la progression des mélanomes, par son rôle dans l'inactivation de la cofiline (Chen et al., 2013; Scott et al., 2009). En effet, une diminution importante de plexine C1 a été montrée dans les métastases de mélanomes (Lazova et al., 2009).

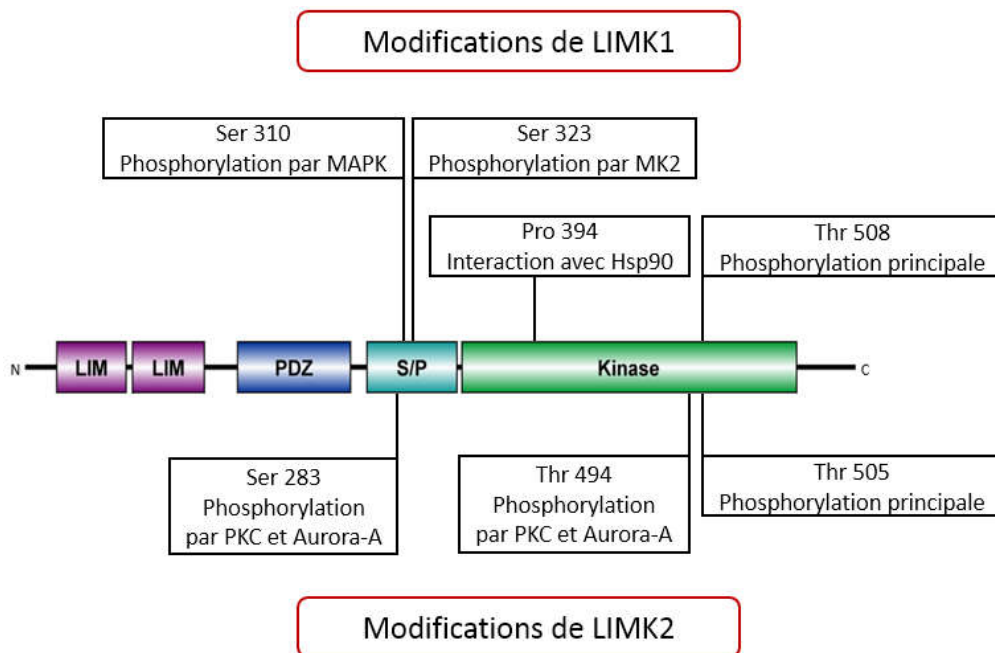


Figure 20 : Modifications des LIM kinases

LIMK1 et LIMK2 sont modifiées par plusieurs protéines, ce qui peut altérer son activité kinase ou sa localisation subcellulaire. Les sites de phosphorylation apparaissent en haut pour LIMK1 et en bas pour LIMK2 (d'après Scott and Olson, 2007).

II.3.2.1.3. Transphosphorylation

La transphosphorylation régule l'activité des LIM kinases de deux manières. D'une part, elle permet d'augmenter la stabilité de la protéine et, d'autre part, elle permet d'augmenter son activité intrinsèque. En effet, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, LIMK1 est relativement instable, avec une demi-vie d'environ 4h. Nous avons vu que les domaines LIM sont capables d'interagir avec le domaine kinase des LIMK et les inhibent, formant ainsi des homodimères tête-bêche. Une interaction entre la proline 394, située dans le domaine kinase de LIMK1, et la protéine Hsp90 (Heat shock protein 90) empêche ce type d'interaction et conduit dans un second temps à une homodimérisation tête-tête suivie d'une transphosphorylation de LIMK1, qui peut ensuite former des dimères stables (Figure 21).

De plus, le traitement de cellules avec des inhibiteurs d'Hsp90 réduit à la fois la quantité de protéines LIMK1 et LIMK2 phosphorylées et le taux de cofiline phosphorylée, montrant que la protéine Hsp90 régule aussi la protéine LIMK2 (Li et al., 2006). Cela est confirmé par le fait que la proline 394 de LIMK1 responsable de l'interaction avec Hsp90 est également présente chez LIMK2 (proline 386). D'autre part, il a été montré que la transphosphorylation ne concernait pas exclusivement la thréonine 508 de LIMK1. Elle permet aussi la phosphorylation de nombreux sites du domaine kinase et, par conséquent, l'augmentation de son activité spécifique (Li et al., 2006).

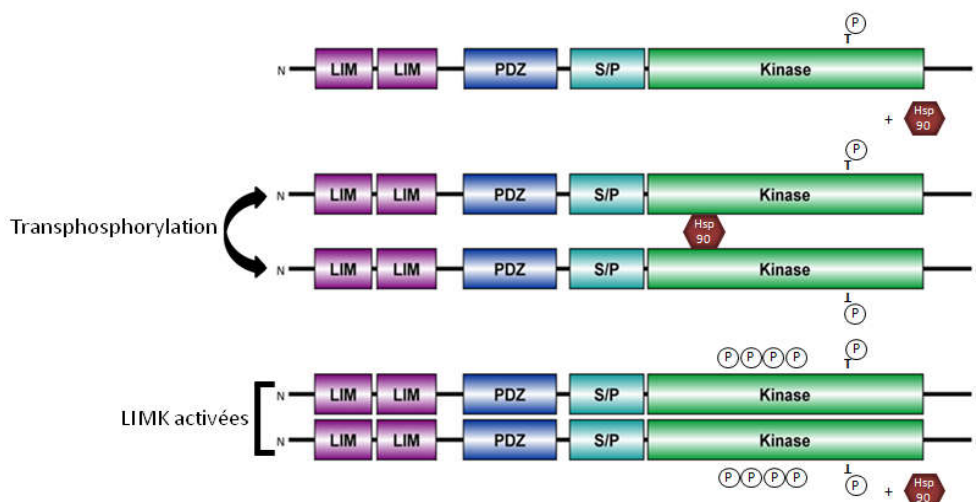


Figure 21 : Rôle de la protéine Hsp90 dans la régulation des LIM kinases
Hsp90 se lie à un motif dans le domaine kinase de LIMK1 ce qui conduit à la formation d'un complexe entre deux protéines LIMK, facilitant ainsi leur transphosphorylation et leur stabilisation. Après la transphosphorylation, Hsp90 se détache des LIMK, permettant l'interaction de ces dernières avec leur substrat (d'après Li et al., 2006).

II.3.2.1.4. Autres régulateurs positifs

D'autres régulateurs positifs des LIMK agissent en marge des voies Rho GTPases et MAPK ou des phénomènes de transphosphorylation régulés par Hsp90. Dans les neurites de neuroblastomes de souris, le Ca²⁺ active la protéine CaMKIV (Calmodulin-dependent protein kinase IV), qui conduit ensuite à la phosphorylation de LIMK1 sur sa thréonine 508 et, ainsi, à son activation (Takemura et al., 2009). LIMK1 peut également être activée par clivage au niveau de son Asp240 par la caspase 3 en réponse à un signal apoptotique (Tomiyoshi et al., 2004). Par ailleurs, la neuréguline et la protéine 14-3-3 augmentent l'activité de LIMK1, la première en interagissant avec ses domaines LIM (Wang et al., 1998), l'autre en interagissant à la fois avec LIMK1 et avec la cofiline (Birkenfeld et al., 2003). LIMK1 peut aussi être activée par la PKC ζ dans les glioblastomes (Guo et al., 2009) et par la PKA. Dans ce dernier cas, ce sont alors les sérines 323 et 596 qui sont phosphorylées (Howe and Juliano, 2000; Nadella et al., 2009). La sérine 596 n'est cependant pas conservée chez LIMK2, ce qui supporte l'idée d'une différence fonctionnelle entre les deux protéines liée à leur régulation.

Cette idée est également étayée par l'existence de régulateurs spécifiques de LIMK1 et de LIMK2. Ainsi, LIMK1 est spécifiquement régulée par l'interaction de son domaine LIM avec la partie intracellulaire de la protéine BMPRII (Bone morphogenic protein receptor II). Des études sur l'impact de cette interaction proposent des résultats contradictoires. Lee-Hoeflich et collaborateurs ont montré qu'au cours de la dendritogenèse induite par BMP7, l'interaction de LIMK1 et de BMPRII était suivie d'une activation de Cdc42 et d'une activation de LIMK1 (Lee-Hoeflich et al., 2004). A l'inverse, Foletta et collaborateurs ont mis en évidence une inactivation de LIMK1 suite à son interaction avec BMPRII. Ils ont également montré que cette inactivation pouvait être atténuée par la présence de BMP4 (Foletta et al., 2003). L'implication de la voie de régulation de LIMK1 par BMPRII dans le neurodéveloppement est détaillée dans la partie II.4.2.2.

D'autre part, la protéine Aurora-A-kinase régule spécifiquement l'activité de LIMK2 en phosphorylant sa thréonine 505, mais également sa localisation subcellulaire en phosphorylant sa sérine 283 et sa thréonine 494. La régulation de la localisation subcellulaire des LIMK est décrite dans la partie II.3.2.3. L'activation de LIMK2 par Aurora-A est suivie par une boucle de régulation positive du taux de phosphorylation d'Aurora-A par LIMK2 (Johnson et al., 2012). Aurora-A est une sérine/thréonine kinase qui favorise la division cellulaire. Elle

est surexprimée dans de nombreux cancers (Mountzios et al., 2008; Nadler et al., 2008), ce qui pourrait entraîner une suractivation de LIMK2. De fait, la suppression de LIMK2 abolit totalement la tumorigenèse due à Aurora-A chez la souris, confirmant un rôle de LIMK2 dans l'oncogenèse (Johnson et al., 2012). Ce rôle est décrit plus précisément dans la partie II.4.1.

II.3.2.2. Inhibition

II.3.2.2.1. Déphosphorylation et inhibition de la phosphorylation

A l'instar de leur activation, l'inactivation des protéines LIMK passe en grande partie par la déphosphorylation ou l'inhibition de la phosphorylation de leurs thréonines 508 et 505.

Les protéines slingshots (SSH) sont connues pour leur rôle de phosphatase et d'activateur de la cofiline (Niwa et al., 2002). Elles sont l'un des inhibiteurs de LIMK1 et de LIMK2, dont elles déphosphorylent les thréonines 508 et 505, respectivement. Toutefois, leur activité phosphatase est plus forte sur LIMK1 que sur LIMK2 (Soosairajah et al., 2005). La protéine SSH1 est régulée négativement par la protéine 14-3-3 (Birkenfeld et al., 2003), qui l'inactive en séquestrant sa forme phosphorylée sur sa sérine 978 dans le cytoplasme. Elle est régulée positivement par la neuréguline qui, à l'opposée, induit la déphosphorylation de sa sérine 978 et lui permet de s'associer aux filaments d'actine F des lamellipodes (Nagata-Ohashi et al., 2004). Il semble intéressant de rappeler que les protéines 14-3-3 et neuréguline activent également LIMK1. La première favoriserait une suractivation de LIMK1 en séquestrant sa forme phosphorylée et en bloquant son inhibition par déphosphorylation tandis que la seconde, en activant de façon coordonnée LIMK1 et SSH1 accélérerait le recyclage de la cofiline, favorisant ainsi le turnover de l'actine. Par ailleurs, LIMK1 et les protéines SSH font partie d'un même complexe protéique (Soosairajah et al., 2005), suggérant un couplage des voies de régulation de la cofiline qui pourrait, dans certains cas, augmenter la vitesse du cycle de phosphorylation/déphosphorylation et favoriser la dynamique de l'actine.

D'autres molécules agissent en inhibant la phosphorylation et donc l'activation des LIMK. Il a été montré que les mutants délétés des domaines LIM et PDZ de LIMK1 ont une activité kinase augmentée. Les domaines LIM et PDZ interagissent avec le domaine kinase de LIMK1 (Hiraoka et al., 1996; Nagata et al., 1999), inhibant la phosphorylation des LIMK par PAK et par ROCK, et donc leur activation (Foletta et al., 2003). D'autres protéines interagissent avec le domaine LIM des LIMK, favorisant vraisemblablement son action inhibitrice.

L'association entre la protéine LATS1 (Large tumor suppressor 1) et LIMK1 résulte en une activation de la cofiline et donc en une régulation de la polymérisation de l'actine (Yang et al., 2004b). De même, la protéine PAR3 (Protease activated receptor 3), impliquée dans la dynamique de l'actine au cours de la formation des jonctions serrées dans les cellules épithéliales, interagit directement et spécifiquement avec les domaines LIM de LIMK2, conduisant à une inhibition de l'activité kinase de LIMK2 (Chen and Macara, 2006).

Par ailleurs, la neurofibromine inhibe également la phosphorylation des LIM kinases (Figure 22). Le domaine N-terminal de NF1 intervient sur l'adhésion et la migration cellulaire en régulant négativement la voie Rac1/PAK1/LIMK1/cofiline (Starinsky-Elbaz et al., 2009). Le mécanisme moléculaire impliqué reste cependant inconnu. En parallèle, la voie Rho/ROCK/LIMK2/cofiline est également régulée par NF1. En effet, une suppression de NF1 conduit à une suractivation de cette voie, affectant la réorganisation du cytosquelette d'actine et la motilité cellulaire (Ozawa et al., 2005). Le mécanisme mis en jeu a été identifié : le domaine SecPH de NF1 interagit avec LIMK2, empêchant sa phosphorylation et, par conséquent, son activation par ROCK (Vallée et al., 2012).

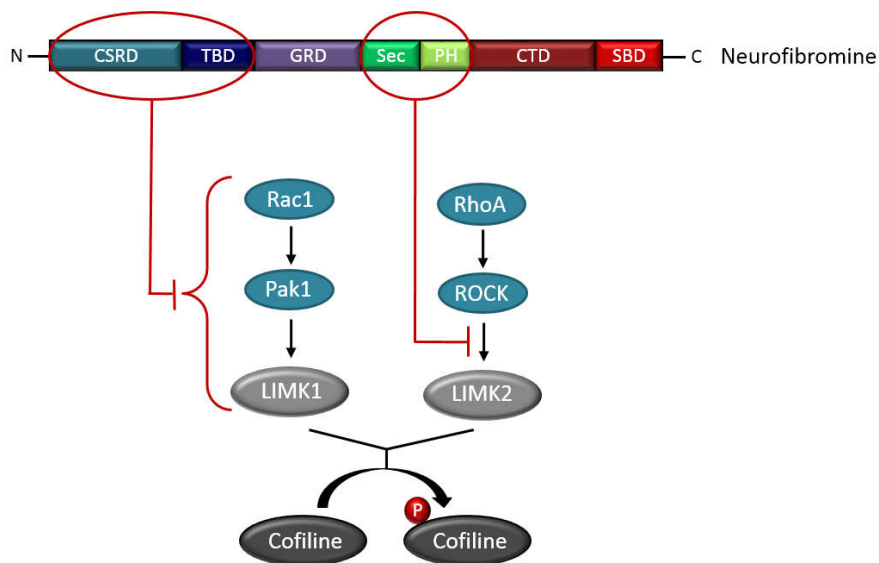


Figure 22 : Régulation des LIM kinases par la neurofibromine
Le domaine CSRD inhibe la voie Rac1/PAK1/LIMK1. Le domaine SecPH inhibe l'activation de LIMK2 par ROCK. Cette régulation conduit à une augmentation du taux de cofiline activée dans la cellule et une dérégulation de cette voie peut être impliquée dans la présentation clinique de la neurofibromatose de type 1.

Enfin, la protéine nischarine régule la migration cellulaire en inhibant l'activation de LIMK1 par PAK1. Elle interagit avec LIMK1, ce qui entraîne une diminution de la

phosphorylation de la thréonine 508 par PAK1, suivie d'une baisse d'activité de LIMK1 et, par conséquent, d'une diminution du taux de cofiline phosphorylée (Alahari et al., 2000; Ding et al., 2008).

II.3.2.2.2. Modulation de la quantité de protéine

La régulation négative des LIMK passe également par le contrôle de la concentration de protéines intracellulaires. Cette concentration est régie par deux mécanismes : l'ubiquitinylation qui conduit à une dégradation de la protéine par le protéasome, et la dégradation des ARNm par des miR avant la traduction.

L'ubiquitinylation est un mécanisme important pour la régulation de la quantité de protéine intracellulaire. Elle affecte à la fois LIMK1 et LIMK2. L'ubiquitine ligase RNF6 (RING finger E3) interagit avec LIMK1 et catalyse sa polyubiquitinylation, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Tursun et al., 2005). Par ailleurs, l'ubiquitine ligase E3 PARKIN, impliquée dans la maladie de Parkinson, interagit à la fois avec LIMK1 et avec LIMK2. L'interaction avec LIMK2 n'a pas été approfondie. En revanche, il a été montré que PARKIN conduisait à l'ubiquitinylation de LIMK1. De manière intéressante, ce mécanisme se produit au niveau des neurones dopaminergiques humains BE(2)-M17 mais pas dans les cellules HEK, ce qui suggère une régulation spécifique au niveau des tissus. De plus, en ubiquitinylant LIMK1, la protéine PARKIN réduit la phosphorylation de la cofiline et l'accumulation de filaments d'actine dans la cellule (Lim et al., 2007). Ces résultats corroborent des études précédentes montrant un rôle de PARKIN dans la stabilisation de l'actine et précisent le mécanisme impliqué (Huynh et al., 2000).

Au niveau du cerveau, la concentration de LIMK1 est également régulée par le microARN MiR134. Les MiR sont des ARN non codant qui modulent la traduction d'ARNm spécifiques (Bartel, 2009). Le MiR134 se lie au domaine 3' UTR de l'ARNm de LIMK1 et bloque sa traduction au cours du développement synaptique (Schratt et al., 2006).

II.3.2.3. Localisation subcellulaire

Les fonctions biologiques des LIM kinases peuvent également être régulées par leur localisation subcellulaire. Ainsi, la phosphorylation de LIMK2 par la PKC au niveau de sa sérine 283 seule (Goyal et al., 2005) ou en association avec sa thréonine 494 bloque l'import

nucléaire dans les cellules endothéliales en inactivant les séquences d'import nucléaire (Goyal et al., 2006).

Par ailleurs, l'import nucléaire de LIMK1 est influencé par son association avec la protéine p57^{KIP2}, inhibitrice de CDK (cycline-dependent kinase). Cette interaction entraîne la translocation de LIMK1 du cytoplasme vers le noyau, sans inhiber son activité kinase. Elle entraîne néanmoins une diminution de la formation de fibres de stress, suggérant une régulation de l'activité cellulaire de LIMK1 *via* sa translocation dans le noyau (Yokoo et al., 2003). La translocation de LIMK1 dans le noyau est également impliquée dans la régulation de la transcription. Ce rôle nucléaire de LIMK1 est décrit dans la partie II.3.3.3.

II.3.3. Substrats des LIM kinases

II.3.3.1. L'ADF/cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine

II.3.3.1.1. L'actine

L'actine est une protéine ubiquiste, importante pour l'architecture de la cellule et de nombreux processus cellulaires. Elle existe sous deux formes : une forme monomérique de 42 kDa (actine globulaire G) et une forme polymérisée (actine fibrillaire F).

La polymérisation de l'actine passe par une première étape de nucléation de trois monomères d'actine liés à l'ATP (Sept and McCammon, 2001). Il s'agit d'une étape limitante, qui dépend de la concentration en monomères d'actine. Les filaments obtenus forment une hélice polarisée qui présente deux extrémités, l'une dite « en brosse » et l'autre « en pointe ». Les monomères liés à l'ATP s'incorporent 10 fois plus rapidement au niveau de l'extrémité en brosse qu'au niveau de l'extrémité en pointe (Pollard, 1986). L'ATP est ensuite rapidement hydrolysée en ADP + Pi puis, plus lentement, le Pi se dissocie de l'ATP. Les monomères liés à l'ADP se décrochent ensuite du filament, l'ADP est échangé contre de l'ATP et les monomères sont à nouveau capables de s'intégrer aux filaments d'actine (Figure 23) (Nürnberg et al., 2011; Pak et al., 2008). La dépolymérisation reste néanmoins très lente, lorsqu'elle s'effectue spontanément, et requiert donc l'intervention de facteurs de dépolymérisation et de sectionnement (Ono, 2007).

Le passage de la forme monomérique à la forme polymérisée, et réciproquement, constitue la dynamique de l'actine. Il s'agit d'un processus fondamental pour de nombreux processus cellulaires, incluant la migration, la morphogénèse, la division, l'endocytose, la sécrétion, l'expression génique et la polarisation. C'est également un processus hautement régulé par de nombreuses protéines de liaison à l'actine. Ces protéines coopèrent, de manière à la fois spatiale et temporelle, pour construire et déconstruire les différentes structures formées par le cytosquelette d'actine.

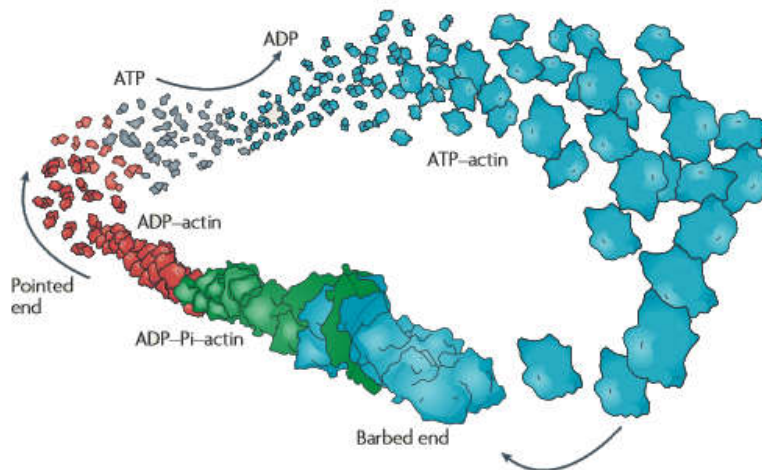


Figure 23 : Dynamique de l'actine

Les monomères d'actine G liés à l'ATP s'ajoutent au niveau de l'extrémité en brosse du filament, puis l'ATP est hydrolysée en ADP + Pi. Le Pi se dissocie ensuite de l'ADP et les monomères se décrochent du filament (Pak et al., 2008). Chacune de ces étapes est régulée par de nombreuses protéines de liaison à l'actine.

Par exemple, lors de la migration cellulaire, le cytosquelette d'actine s'organise pour former les filopodes, qui permettent à la cellule de s'orienter, les lamellipodes, qui poussent la membrane dans le sens du mouvement, et les fibres de stress, qui connectent la cellule à la matrice extracellulaire par les points focaux d'ancrage et favorisent le mouvement grâce à leurs interaction avec la myosine (Figure 24) (Blanchoin et al., 2014). Lorsque les cellules entrent en mitose, le réseau d'actine est rapidement réorganisé, conférant aux cellules mitotiques leur forme ronde caractéristique. A la fin de la mitose, l'actine se réarrange en un sillon de clivage qui forme une partie de l'anneau contractile responsable du processus de cytokinèse. L'actine joue également un rôle important dans la séparation des centrosomes, en association avec le réseau de myosine et les microtubules (Heng and Koh, 2010).

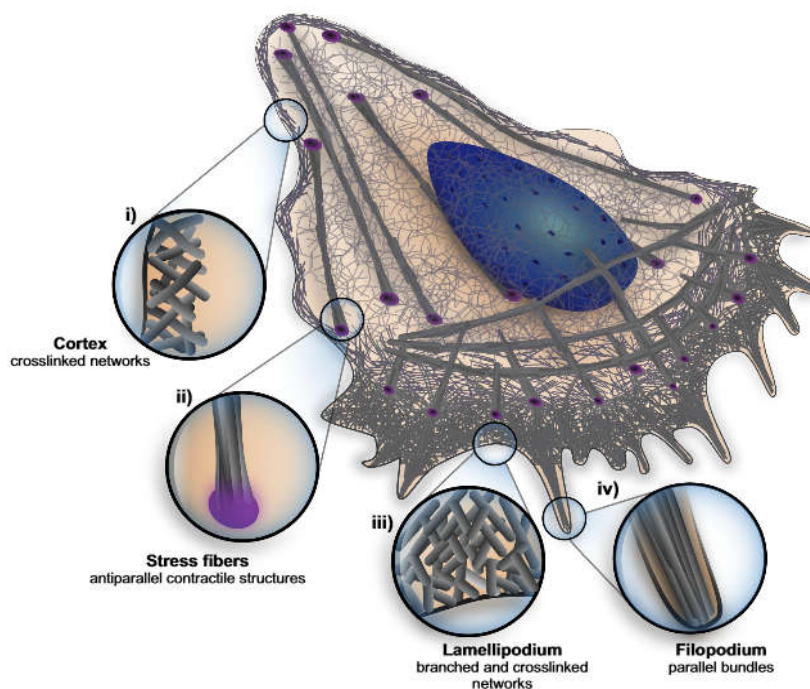


Figure 24 : Organisation de l'actine dans une cellule en migration

Plusieurs types d'architectures sont représentés. Le cortex cellulaire (i) participe au maintien ou aux modifications de la forme de la cellule en se contractant grâce à l'activité de la myosine. Les fibres de stress (ii) font partie d'un réseau de filaments qui connecte le cytosquelette à la matrice extracellulaire par les sites d'adhésion focaux. Les lamellipodes (iii) sont des réseaux d'actine branchée qui constituent le moteur de la cellule. Les filopodes (iv) sont des faisceaux serrés situés à l'avant de la cellule, lui permettant de s'orienter (Blanchoin et al., 2014).

II.3.3.1.2. La cofiline

La famille de la cofiline joue un rôle essentiel dans la dynamique de l'actine en favorisant le sectionnement et la dépolymérisation des filaments d'actine (Bamburg and Wiggan, 2002; Bernstein and Bamburg, 2010; Moon and Drubin, 1995; Van Troys et al., 2008). Chez les eucaryotes, elle comprend trois protéines : la cofiline 1 ou cofiline non musculaire, la cofiline 2 ou cofiline musculaire et la destrine ou facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF). Les trois pourraient avoir des rôles distincts sur la dynamique de l'actine en fonction du type cellulaire dans lequel elles sont exprimées (Vartiainen et al., 2002). Dans ce manuscrit, nous utiliserons le terme de « cofiline » pour désigner indistinctement l'une de ces protéines, sauf s'il est nécessaire de les différencier.

Lorsqu'elle est active, la cofiline se fixe préférentiellement aux filaments d'actine liés à l'ADP, à proximité de l'extrémité en pointe. Elle favorise la dépolymérisation de l'actine en

sectionnant les filaments d'actine, accélérant ainsi le désassemblage des filaments et la libération de monomères (Jiang et al., 1997; Moriyama and Yahara, 1999; Ono et al., 2001; Pope et al., 2000). Ce phénomène entraîne une augmentation de la concentration cellulaire en actine monomérique, favorisant ainsi la polymérisation de l'actine et donc le renouvellement du taux de filaments d'actine dans la cellule (Hotulainen et al., 2005; Kiuchi et al., 2007, 2011). La cofiline contribuerait également à la polymérisation de l'actine en sectionnant les filaments d'actine et en créant ainsi de nouvelles extrémités en brosse, auxquelles peuvent s'ajouter de nouveaux monomères (DesMarais et al., 2005; Ghosh et al., 2004; Mizuno, 2013; Oser and Condeelis, 2009).

II.3.3.1.3. Rôle des LIM kinases sur l'actine

Les LIMK sont principalement connues pour phosphoryler la cofiline sur sa sérine 3 et, par conséquent, l'inactiver (Arber et al., 1998a; Maekawa et al., 1999; Sumi et al., 1999; Yang et al., 1998b). La cofiline peut ensuite être déphosphorylée par des phosphatases incluant principalement les slingshots (SSH) (Niwa et al., 2002), la chronophine (CIN) (Gohla et al., 2005) et les phosphatases 1 et 2A (PP1/2A) (Meberg et al., 1998) (Figure 25).

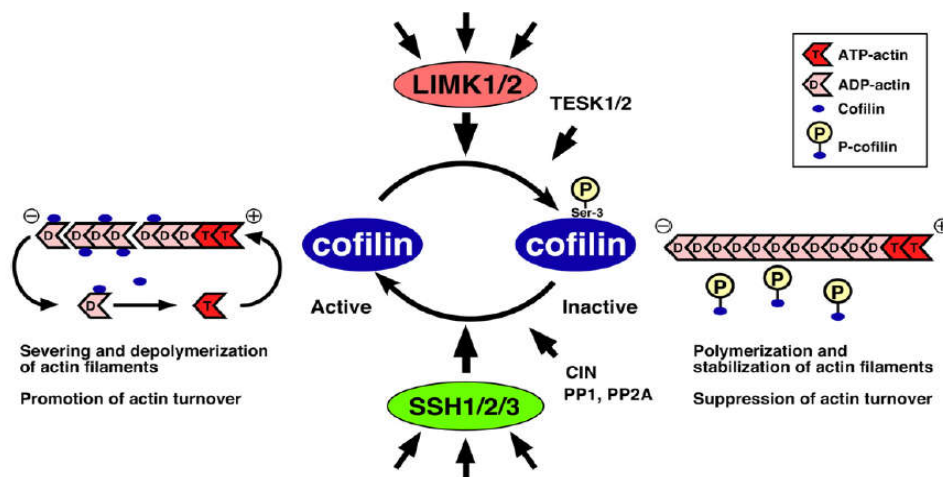


Figure 25 : Les LIMK phosphorylent et inactivent la cofiline. La cofiline se fixe préférentiellement à l'actine-ADP, stimule le sectionnement et la dépolymérisation de l'actine et promeut le turnover des filaments d'actine. La cofiline est inactivée par les protéines LIMK et TESK et réactivée par les protéines SSH, CIN, PP1 et PP2A (Mizuno, 2013).

L'alternance de phosphorylation et de déphosphorylation de la cofiline joue un rôle fondamental dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et, ainsi, dans de nombreuses

fonctions cellulaires telles que la migration et la division cellulaire, la neuritogenèse et la plasticité synaptique.

II.3.3.2. Les tubulines et la protéine TPPP/p25

II.3.3.2.1. La tubuline et les microtubules

A l'instar de l'actine, les tubulines sont des protéines ubiquistes de 50 kDa qui s'associent pour former les microtubules (MT). Elles sont également impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Les tubulines les plus étudiées sont les tubuline α et β , qui sont l'unité structurale de base des MT. Les deux sont liés au GTP mais seul le GTP associé à la tubuline β peut être hydrolysé en GDP + Pi (Mandelkow et al., 1988). Il existe aussi une tubuline γ impliquée dans les premières étapes de formation des MT, au niveau d'un centre organisateur appelé centrosome (Erickson, 2000; Inclán and Nogales, 2001).

Les tubulines α et β forment des hétérodimères qui s'assemblent en protofilaments linaires. Chaque MT est composé de 13 protofilaments qui forment un cylindre vide de 24 nm (Figure 26) (Desai and Mitchison, 1997; Löwe et al., 2001; Nogales et al., 1998; Tuszynski et al., 2006). Les microtubules présentent une polarité structurale, avec une extrémité négative qui expose la tubuline α et une extrémité positive qui expose la tubuline β . L'extrémité négative est reliée au centrosome tandis que l'extrémité positive s'étend dans toute la cellule. L'assemblage se fait préférentiellement sur le pôle positif suivant un comportement d'instabilité dynamique qui allie assemblage et désassemblage rapide des MT. Les hétérodimères de tubuline se décrochent lorsque le GTP associé à la tubuline β est hydrolysé en GDP. La transition entre assemblage et désassemblage est appelée catastrophe, tandis que la transition inverse constitue le sauvetage (Mitchison and Kirschner, 1984) (Figure 26). Cette instabilité dynamique est l'une des propriétés principales des microtubules et lui confère ses propriétés cellulaires.

Les MT participent au maintien de la forme cellulaire. Ils interviennent également dans des phénomènes moteurs, en particulier dans le déplacement des vésicules et des organites à travers la cellule, et dans la migration des chromosomes au cours de la mitose, grâce au fuseau mitotique. Il est intéressant de noter que les microtubules agissent en synergie avec le cytosquelette d'actine pour réguler à la fois la migration cellulaire et la mitose (Figure 27).

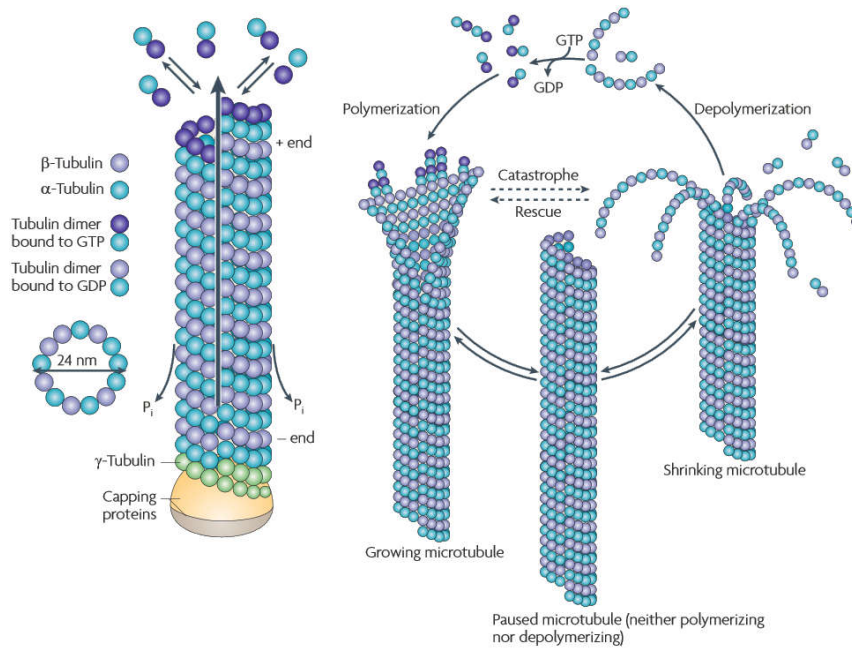


Figure 26 : Polymérisation des microtubules

Les microtubules se composent d' α - et de β -tubuline, assemblées en protofilaments linéaires. Un microtubule contient entre 10 et 15 protofilaments qui forment un cylindre creux de 24 nm. Les microtubules peuvent grandir rapidement par polymérisation ou s'effondrer par dépolymérisation, en fonction du nombre de tubulines qu'ils contiennent (Conde and Cáceres, 2009).

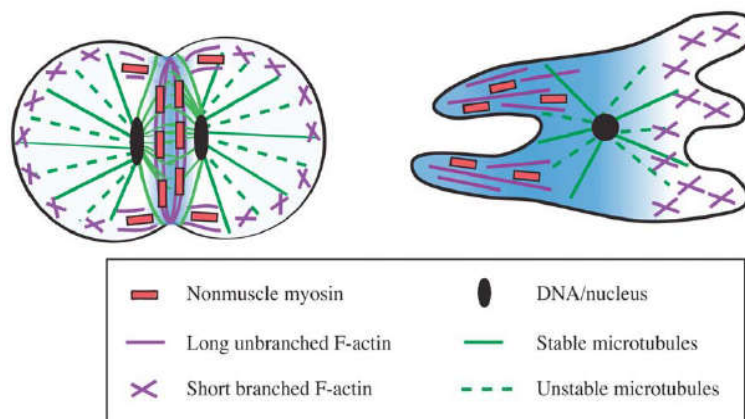


Figure 27 : L'actine et les microtubules lors de la mitose et de la migration cellulaire

Pendant la division cellulaire (à gauche), les microtubules forment le fuseau mitotique qui sépare les chromosomes tandis que l'actine forme l'anneau contractile qui clive les deux cellules filles. Au cours de la migration cellulaire (à droite), le cytosquelette d'actine s'organise pour favoriser le mouvement de la cellule et les microtubules permettent le déplacement des organites et des vésicules dans toute la cellule (Akhshi et al., 2014).

II.3.3.2. Rôle des LIM kinases sur les microtubules

Le cytosquelette d'actine et les MT agissent de manière synergique dans la cellule. Par exemple, le désassemblage des MT favorise la formation des fibres de stress et améliore la contractibilité des cellules (Danowski, 1989). Les LIMK sont non seulement impliquées dans la polymérisation de l'actine, mais semble également jouer un rôle dans le réarrangement des microtubules. Leur localisation au cours du cycle cellulaire, décrite dans la partie II.2., suggère leur implication dans la régulation des MT. LIMK1 est localisée aux extrémités des fuseaux mitotiques formés par les microtubules de la prométaphase à l'anaphase avant d'être redistribuée au niveau de l'anneau de clivage, constitué de filaments d'actine, au cours de la télophase. LIMK2 s'accumule au niveau du centrosome pendant la prophase et de la prométaphase, est ensuite localisée au niveau du fuseau mitotique pendant la métaphase et le début de l'anaphase, puis est observée au centre de fuseaux mitotiques à la fin de l'anaphase et pendant la télophase (Sumi et al., 2006). Il a également été montré que LIMK1 inhibait le désassemblage des MT dans les cellules endothéliales (Gorovoy et al., 2005) et qu'elle était requise pour l'organisation des microtubules au cours de la méiose chez la souris (Li et al., 2016), tandis que LIMK2 était importante pour la formation du fuseau mitotique (Po'uha et al., 2010).

Les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal connus. Des études ont montré que LIMK1 et LIMK2 interagissaient avec TPPP et la phosphorylaient. La protéine TPPP (Tubulin polymerization promoting protein) ou p25 module la dynamique et la stabilité des MT en favorisant à la fois la polymérisation des tubulines et le regroupement des MT. Elle interagit avec la protéine HDAC6 (Histone deacetylase 6), une enzyme de désacétylation de la tubuline, inhibant son activité, et contrôle ainsi le taux d'acétylation des MT (Hlavanda et al., 2002; Lehotzky et al., 2004; Tirián et al., 2003). La phosphorylation de TPPP inhiberait sa capacité à favoriser la polymérisation de la tubuline (Acevedo et al., 2007; Heng et al., 2012). De plus, LIMK2 régulerait l'organisation des microtubules astraux et l'orientation du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire dans les cellules HeLa suite à son action sur TPPP (Heng et al., 2012).

Cependant, d'autres données montrent que les LIMK n'interagissent pas avec TPPP, qui serait phosphorylée directement par la protéine ROCK (Schofield et al., 2012). Les LIMK réguleraient les microtubules en interagissant directement avec la tubuline. Les formes

phosphorylées des LIMK sont co-localisées avec la tubuline γ durant les premières phases de la mitose, avant de s'accumuler au niveau de l'anneau de clivage à la fin de la télophase (Chakrabarti et al., 2007). De plus, une étude récente a montré une interaction directe entre la tubuline γ et LIMK1 au cours de la méiose, lorsque LIMK1 est phosphorylée (Li et al., 2016). D'autres études sont cependant encore requises pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des microtubules par les LIMK.

II.3.3.3. Les facteurs de transcription CREB et NURR1

Les facteurs de transcription sont des protéines qui se fixent sur les séquences régulatrices des gènes, inhibant ou favorisant leur transcription. L'identification des facteurs de transcription CREB (cAMP-response element binding-protein) (Yang et al., 2004a) et NURR1 (Nuclear receptor related 1 protein) (Sacchetti et al., 2006) comme substrats de LIMK1 suggère un rôle des LIMK dans la régulation de la transcription. Le facteur CREB régule de nombreux gènes en aval de l'AMPc en se fixant au site promoteur CRE (cAMP-response element). Il est impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire dans de nombreuses lignées. La stimulation de cellules progénitrices d'hippocampe par le facteur de croissance FGF2 (Fibroblast growth factor 2) permet à LIMK1 d'interagir avec CREB, qui est alors phosphorylé sur sa sérine 133 et activé. Cette phosphorylation se produit en aval des voies Rac et Cdc42 en passant par PAK1 (Yang et al., 2004a). Plus récemment, l'interaction entre CREB et LIMK1 a été impliquée dans la régulation de la mémoire à long terme et de la plasticité synaptique chez la souris (Todorovski et al., 2015). Le rôle de CREB dans ces processus neuronaux avait déjà été montré par ailleurs, sans que le mécanisme moléculaire impliqué ait été identifié (Yin and Tully, 1996; Zhou et al., 2009).

NURR1 appartient à une famille de récepteurs qui régule la transcription génique suite à une réponse hormonale. Il joue notamment un rôle important dans les neurones dopaminergiques au cours du développement (Perlmann and Wallén-Mackenzie, 2004). L'activité transcriptionnelle de NURR1 est régulée par de nombreuses kinases, dont LIMK1 dans les neurones mésencéphaliques CSM14.1. La phosphorylation de NURR1 par LIMK1, conduit à une diminution de son activité transcriptionnelle (Sacchetti et al., 2006). Par ailleurs, NURR1 est également inhibée par p57^{kip2}, un inhibiteur de kinase dépendant des cyclines, également connu pour son interaction avec LIMK1 et responsable d'une

translocation de cette dernière dans le noyau. Cette interaction est spécifique de LIMK1 dans la mesure où p57^{kip2} n'interagit pas avec LIMK2 (Joseph et al., 2003; Vlachos and Joseph, 2009). Puisque NURR1 et LIMK1 interagissent toutes les deux avec p57^{kip2}, et que p57^{kip2} régule négativement l'activité de NURR1, il semble logique de supposer qu'il existe une relation fonctionnelle entre ces trois protéines.

II.4. Physiopathologie

II.4.1. Rôle des LIM kinases dans la tumorigenèse

II.4.1.1. Prolifération cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus complexe qui nécessite une modulation de la dynamique de l'actine et des microtubules ainsi qu'une expression spécifique de certains gènes. Compte tenu de leur rôle modulateur dans la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules, il semble logique que les LIMK participent à la régulation de ce processus. Plusieurs études mettent en évidence un rôle différent de LIMK1 et de LIMK2 dans le cycle cellulaire.

Nous avons déjà vu dans le paragraphe II.2. que leur localisation subcellulaire était différente et variait au cours du cycle cellulaire (Sumi et al., 2006). Elles auraient également des rôles cellulaires différents. En effet, LIMK1 serait également plutôt impliquée dans l'orientation du fuseau mitotique et dans la cytokinèse tandis que LIMK2 participerait à la régulation du cycle cellulaire en agissant à la fois sur les cyclines et sur la cofiline (Croft and Olson, 2006; Kaji et al., 2008).

Au début de la mitose, pendant la prométaphase et la métaphase, LIMK1 est hyperphosphorylée. Puis le taux de phosphorylation de LIMK1 diminue jusqu'à un niveau basal jusqu'à la cytokinèse (Amano et al., 2002; Sumi et al., 2002). Cette suractivation peut être bloquée par des inhibiteurs de CDK, suggérant que LIMK1 pourrait être activée par des CDK (Sumi et al., 2002). Par ailleurs, la localisation subcellulaire de LIMK1 varie au cours du cycle cellulaire. Elle apparaît au niveau des pôles du fuseau mitotique de la prophase à la métaphase (Sumi et al., 2006), et au niveau de l'anneau contractile pendant la cytokinèse (Kaji et al., 2003). Une suppression ou une inactivation de LIMK1 conduit à une désorientation du fuseau mitotique. Une perturbation similaire peut être induite par une inhibition de la

polymérisation de l'actine par la latrunculine A ou par la surexpression de cofiline non phosphorylable S3A (Kaji et al., 2008). Lorsque, à l'inverse, LIMK1 est surexprimée, le taux de cofiline phosphorylée est augmenté ce qui entraîne une augmentation du nombre de cellules multinucléées (Amano et al., 2002; Kaji et al., 2003). LIMK1 serait donc impliquée dans la régulation de la mitose et de la cytokinèse par son rôle sur la phosphorylation de la cofiline et, par conséquent, sur la dynamique de l'actine. Elle favoriserait également le passage en phase M. En effet, il a été montré qu'une diminution du taux de LIMK1 bloque le cycle cellulaire en phase G2 (Davila et al., 2003).

Par ailleurs, la formation du complexe D1-CDK4, requis pour le passage en phase S, entraîne une surexpression de LIMK2 (Kim et al., 2014) tandis que la translocation de LIMK2 dans le noyau conduit à une diminution de l'expression de la cycline D1 (Goyal et al., 2005). Il pourrait s'agir d'une boucle de rétrocontrôle négatif de l'expression de LIMK2 suite à la formation du complexe D1-CDK4. Par ailleurs, la phosphorylation de LIMK2 par ROCK favorise l'expression de la cycline A, impliquée dans la transition entre la phase S et la phase G2 (Croft and Olson, 2006).

L'activité de LIMK2 ne change pas après le passage en phase S. Cependant, quand les cellules sont traitées au nocodazole ou au taxol, qui perturbent les MT et bloquent la cellule en phase M, LIMK2 est activée, suggérant que cette protéine pourrait être impliquée dans un point de contrôle (Sumi et al., 2006). De fait, suite à des lésions de l'ADN, la protéine p53 favorise l'expression de l'isoforme LIMK2-2b. La p53 est un facteur de transcription impliqué dans le maintien de l'intégrité de la cellule, soit par arrêt du cycle cellulaire suivi de l'activation de mécanismes de réparation de l'ADN, soit par apoptose. Une suppression de LIMK2-2b conduit à un passage de la phase G2 à la phase M tandis qu'une surexpression de LIMK2-2b prolonge l'arrêt du cycle cellulaire en G2. La présence d'une cofiline constitutivement inactive suffit à compenser l'absence de LIMK2-2b, suggérant que cette isoforme régule négativement le passage en phase M en phosphorylant la cofiline et, par conséquent, en régulant la dynamique de l'actine (Hsu et al., 2010). Il est intéressant de rappeler que la p53 favorise aussi l'expression de l'ARNm de LIMK2-1 (Croft et al., 2011). Le rôle de cette isoforme dans le cycle cellulaire n'a pas été étudié à ce jour.

Les protéines LIMK sont impliquées dans le développement de nombreux cancers et elles sont surexprimées dans plusieurs d'entre eux (prostate, sein, foie, peau,) ainsi que dans

la neurofibromatose de type 2 et au niveau de différentes lignées de cellules cancéreuses. Dans la neurofibromatose de type 2, l'inhibition des LIMK surexprimées et suractivées dans les tumeurs associées à la maladie bloque les cellules en phase G2 (Petrilli et al., 2014). De façon surprenante, Lourenço et collaborateurs ont montré que l'expression de LIMK2 était, au contraire, réduite dans les tumeurs intestinales de souris et les cancers colorectaux humains. Le taux de protéine diminue avec l'avancée de la maladie et un faible taux de LIMK2 est associé à une diminution de la survie des patients. Ces données suggèrent un rôle répressif de LIMK2 dans la prolifération des cellules souches intestinales (Lourenço et al., 2014). De même, l'expression de LIMK2 apparaît diminuée dans le cancer de la thyroïde (Hsu et al., 2010). Ainsi, le rôle des LIMK dans la prolifération des cellules cancéreuses et le développement tumoral est nuancé et dépend des cancers considérés. Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe II.4.1.3.

II.4.1.2. Apoptose

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée, dérégulé dans certains cancers. Plusieurs études tendent à montrer un rôle de LIMK2 dans ce processus. Dans des cellules du cancer de la prostate (DU145 et LNCaP), la stimulation des récepteurs membranaires aux androgènes active la réorganisation du cytosquelette d'actine et favorise l'apoptose. Papadopoulou et collaborateurs ont montré que la voie Rho/ROCK/LIMK2 était impliquée dans ce mécanisme dans les deux types cellulaires (Papadopoulou et al., 2008).

Par ailleurs, suite à un dommage de l'ADN, l'expression des isoformes LIMK2-2b et LIMK2-1 *via* la protéine p53 favoriserait la survie des cellules (Croft et al., 2011). De plus, une augmentation de l'expression de LIMK2 est corrélée à une chimiorésistance à 18 drogues anti-cancéreuses (Dan et al., 2002). Des lignées de neuroblastomes sélectionnées pour leur résistance à la vincristine, la vinblastine ou le désoxyépothilone B présentent une augmentation de l'expression de LIMK2, tandis qu'une suppression de l'expression de LIMK2 augmente la sensibilité des cellules de neuroblastomes à la vincristine (Po'uha et al., 2010). Ces études ouvrent des perspectives sur l'utilisation d'inhibiteurs de LIMK2 comme cible thérapeutique dans certains cancers.

LIMK2 a également été impliqué dans la mort neuronale programmée. Ces données sont présentées dans la revue « Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction » (partie II.4.2.2.).

II.4.1.3. Migration cellulaire

La migration cellulaire est essentielle à de nombreux processus physiologiques, notamment pendant le développement embryonnaire, dont le développement neuronal, et, à l'âge adulte, lors de la réponse immunitaire. Elle dépend en grande partie de la réorganisation du cytosquelette d'actine. Au cours de la migration cellulaire, l'extrémité en brosse des filaments d'actine est orientée vers la membrane plasmique au niveau des filopodes et des lamellipodes. L'élongation de ces filaments pousse le bord de la cellule vers l'avant (Chhabra and Higgs, 2007; Pollard and Borisy, 2003), tandis que les fibres de stress, composées d'actine et de myosine, fournissent les forces contractiles nécessaires à la migration (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Pellegrin and Mellor, 2007) (Figure 28).

LIMK1 et LIMK2 pourraient jouer des rôles complémentaires, du fait de leurs voies d'activation différentes. En effet, LIMK1 est préférentiellement activée par Rac1 et Cdc42, tandis que LIMK2 est activée par Cdc42 et RhoA. Or, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans la formation des lamellipodes et des filopodes, respectivement, tandis que RhoA est plutôt associée à la formation des fibres de stress (Hall, 1998).

Les différentes étapes qui sous-tendent la migration cellulaire nécessitent une régulation fine. Ainsi, une surexpression de LIMK1 peut conduire à une accumulation aberrante de filaments d'actine et supprimer la motilité cellulaire (Dawe et al., 2003; Zebda et al., 2000) alors qu'une suppression de LIMK1 inhibe la formation des lamellipodes et la migration cellulaire (Nagata-Ohashi et al., 2004; Nishita et al., 2002, 2005). LIMK1 pourrait ainsi jouer un rôle à la fois positif et négatif dans l'extension des lamellipodes. L'inactivation de la cofiline par LIMK1 peut, d'une part, favoriser la formation et l'extension des lamellipodes en stabilisant les filaments d'actine, et, d'autre part, inhiber l'extension des lamellipodes en diminuant le taux d'actine G renouvelé par la cofiline activée (Ohashi et al., 2011).

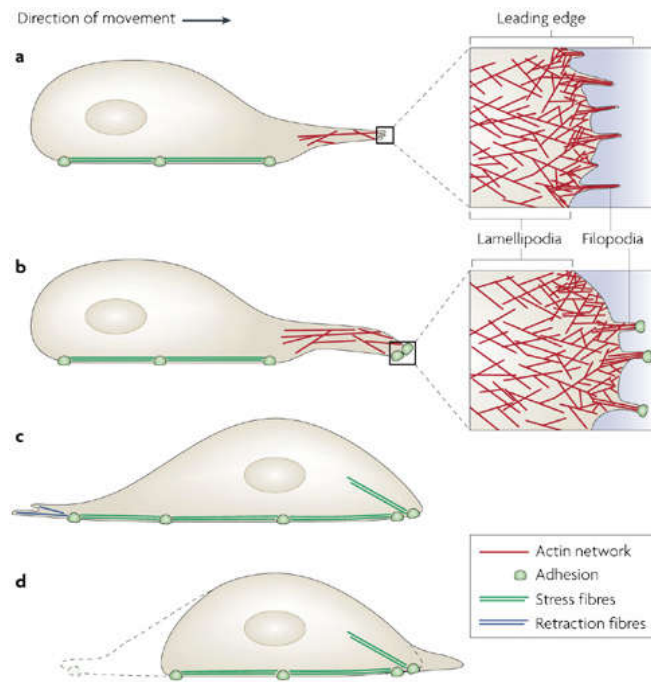


Figure 28 : Rôle du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire

(a) La migration est initiée par les filopodes et les lamellipodes à l'avant de la cellule. Ces structures contiennent des filaments d'actine, dont l'extrémité en brosse est située contre la membrane plasmique. (b) Au cours de l'extension de la cellule, de nouvelles adhésions avec le substrat sont formées à l'avant de la cellule. (c) Le noyau et le cytoplasme sont déplacés grâce aux points d'adhésion focaux et aux forces exercées par les fibres de stress. (d) La rétraction des fibres tire l'arrière de la cellule vers l'avant et les points d'adhésion situés à l'arrière se désassemblent (Mattila and Lappalainen, 2008).

LIMK1 agit de manière synergique avec SSH1 et le rôle combiné de ces deux protéines a été étudié dans les lymphocytes T humains Jurkat stimulés par SDF-1 (Stroma cell-derived factor 1). La suppression de l'expression de LIMK1 inhibe la formation des lamellipodes et la migration cellulaire tandis que la suppression de l'expression de SSH1 entraîne la formation de lamellipodes orientés dans toutes les directions. LIMK1 serait donc requise pour la formation des lamellipodes tandis que SSH1 permettrait de diriger la migration. La stimulation des cellules Jurkat par SDF-1 active Rac1 puis LIMK1 (Nishita et al., 2002, 2005), ce qui entraîne une augmentation transitoire du taux de cofiline phosphorylée, une polymérisation de l'actine et la formation de nombreux lamellipodes. SSH1 favoriserait ensuite la transition entre une multitude de lamellipodes et un seul lamellipode, orienté vers l'avant de la cellule. La réactivation de la cofiline permettrait également le renouvellement du filament d'actine au niveau du lamellipode, tandis que LIMK1 pourrait stabiliser les filaments

à l'arrière de la cellule (Mizuno, 2013; Nishita et al., 2005). Ce modèle dénote d'un rôle à la fois spatial et temporel de LIMK1 sur la migration cellulaire.

Ce rôle est perturbé dans de nombreux cancer. Dans les cancers des os et de la prostate, une expression ectopique de LIMK1 rend les tumeurs plus invasives, à l'inverse d'une suppression ou d'une inactivation de LIMK1 (Davila et al., 2003; Yoshioka et al., 2003). De même, dans les cellules d'hépatomes ascitiques de rats et dans les cellules T Jurkat, la suppression de LIMK1 est à l'origine d'une inhibition de la motilité des cellules (Horita et al., 2008; Nishita et al., 2005). Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de la neurofibromine entraîne une suractivation de la voie RhoA/ROCK/LIMK2, à l'origine d'une augmentation de la quantité de fibres de stress favorisant la migration cellulaire. Ce mécanisme pourrait être associé à la cancérogenèse dans la neurofibromatose de type 1 (Ozawa et al., 2005). De manière intéressante, dans les cellules de carcinome mammaire, dans les neuroblastomes et dans les fibroblastes transformés par Ras, une surexpression de LIMK1 conduit, à l'opposé, à une diminution ou à une suppression des capacités invasives des cellules (Meyer et al., 2005; Nishita et al., 2005; Sahai et al., 2001; Zebda et al., 2000). LIMK1 pourrait donc à la fois inhiber et promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses, en fonction du contexte intra- et extra-cellulaire (Mizuno, 2013).

L'expression des LIMK a été étudiée sur plusieurs populations de tumeurs et les résultats sont contrastés. Weng et collaborateurs, en travaillant sur des tumeurs invasives de rat issues de la lignée MTLn3, montrent l'importance de l'activation de la cofiline dans la migration cellulaire et le potentiel métastatique des tumeurs. Ils montrent également que la surproduction de LIMK1 n'induit une augmentation de l'invasion cellulaire que dans un contexte cellulaire dans lequel elle pourrait augmenter l'activation de la cofiline (Wang et al., 2006). Une augmentation de l'expression de LIMK1 et SSH1 est également retrouvée dans des tumeurs mammaires invasives de souris (Wang et al., 2007). Ces données et d'autres montrent l'importance de la surproduction de SSH1 dans le potentiel métastatique de certaines lignées cancéreuses du pancréas (Wang et al., 2015) et soulignent l'importance du cycle d'activation et de désactivation de la cofiline dans la migration cellulaire et son rôle dans l'invasion des tumeurs.

Les tumeurs peuvent migrer sous deux formes : la forme mésenchymateuse allongée et la forme amiboïde ronde. La forme mésenchymateuse migre suite à la formation

d'invadopodes et à la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. Sous forme amiboïde, les cellules migrent par des interstices en utilisant les protrusions cellulaires et les forces basées sur l'actomyosine. Le passage de la forme mésenchymateuse à la forme amiboïde et inversement dépend des conditions intra- et extracellulaires (Friedl and Alexander, 2011; Sahai, 2007).

La voie Rho/ROCK favorise le passage de la forme mésenchymateuse à la forme amiboïde dans les cellules de fibrosarcome HT1080 en activant à la fois LIMK1 et la protéine MLC (Mishima et al., 2010). En revanche, la phosphorylation de LIMK2 par ROCK1 est impliquée dans la migration mésenchymateuse mais pas dans la migration amiboïde d'une forme extrêmement invasive de tumeurs mammaires humaines (MDA-MB231). Dans ces mêmes cellules, ROCK1 est capable de phosphoryler LIMK1 mais phosphoryle préférentiellement LIMK2 (Shea et al., 2008). Les voies d'activation des LIMK semblent donc être dépendantes du type de tumeur considéré, de même que la forme prise par les tumeurs pour migrer. Par ailleurs, dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 dans lesquelles la forme mésenchymateuse est favorisée, les LIMK affectent la capacité des cellules à former des invadopodes et à dégrader la matrice extracellulaire et donc l'invasion collective des cellules dans des matrices tridimensionnelles. Par contre, les LIMK ne sont pas nécessaires à la motilité des cellules en 2D (Scott et al., 2010; Yamaguchi and Condeelis, 2007).

II.4.2. Rôle des LIM kinases dans les fonctions et dysfonctions du système nerveux

II.4.2.1. Résumé

De nombreuses études montrent un rôle des LIMK dans le fonctionnement du système nerveux central. Dans cette revue, nous avons détaillé les voies et mécanismes moléculaires impliquant les LIMK dans le neurodéveloppement et la plasticité synaptique. Nous avons également présenté l'implication des LIMK dans les pathologies neuronales, incluant le syndrome de Williams, la déficience intellectuelle, la schizophrénie, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ainsi que la neurofibromatose. Enfin, nous avons traité de l'existence d'une voie des LIMK indépendante de la cofiline impliquée dans les fonctions neuronales.

II.4.2.2. Revue

La revue “Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction.” a été publiée dans FEBS Letters.



FEBS
Letters

journal homepage: www.FEBSLetters.org



Review

Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction



H. Cuberos^{a,b,*}, B. Vallée^a, P. Vourc'h^{b,c}, J. Tastet^d, C.R. Andres^{b,c,1}, H. Bénédicti^{a,1}

^a CNRS UPR 4301, CBM, Orléans, France

^b UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

^c CHRU de Tours, Service de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Tours, France

^d University Medical Center Utrecht, Brain Center Rudolf Magnus, Utrecht, Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2015

Revised 21 October 2015

Accepted 28 October 2015

Available online 3 November 2015

Edited by Michael R. Bubb

Keywords:

LIM kinase 1

LIM kinase 2

Neuronal function

Neurodevelopmental disease

Neurodegenerative disease

ABSTRACT

LIM kinase 1 (LIMK1) and LIM kinase 2 (LIMK2) regulate actin dynamics by phosphorylating cofilin. In this review, we outline studies that have shown an involvement of LIMKs in neuronal function and we detail some of the pathways and molecular mechanisms involving LIMKs in neurodevelopment and synaptic plasticity. We also review the involvement of LIMKs in neuronal diseases and emphasize the differences in the regulation of LIMKs expression and mode of action.

We finally present the existence of a cofilin-independent pathway also involved in neuronal function. A better understanding of the differences between both LIMKs and of the precise molecular mechanisms involved in their mode of action and regulation is now required to improve our understanding of the physiopathology of the neuronal diseases associated with LIMKs.

© 2015 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The human brain is a complex network consisting of hundreds of billions of interconnected neurons. The development of functional neural circuits requires highly regulated stages. During neurodevelopment, neurons migrate to their specific localizations. They develop dendrites and axons that connect to their targets and form synapses. These connections remain dynamic throughout life. They disappear or become more complex in a process called synaptic plasticity.

Actin filaments and microtubules (MTs) are two major components of the neuronal cytoskeleton. Actin exists in two forms, monomeric (G-actin) or polymerized (F-actin). The actin cytoskeleton is composed of F-actin filaments that may bundle together or associate in a branched and cross-linked network. A battery of accessory proteins sculpts the network and controls its dynamics and mechanics. This network, localized near the plasma membrane, determines cell shape, stiffness and movement. The balance between G-actin and F-actin participates in actin dynamics, which play an important role in growth cone morphology and motility, in neurite outgrowth and in axonal guidance [1]. In mature neurons, actin contributes to the formation of synapses [2], dendritic spine dynamics [3,4] and receptor trafficking and anchorage [5,6].

MTs are cylindrical polymers built up from α - and β -tubulin heterodimers. These tubulin polymers switch stochastically between polymerization and depolymerization. The dynamics of MTs are essential to successfully complete all the different stages of neuronal development [7]. They are regulated by a large number of factors, including microtubule-associated proteins (MAPs), motor proteins and post-translational tubulin modifications [8–10].

LIM kinases are serine/threonine kinases that play a key role in actin and microtubules dynamics [11]. They comprise two members: LIMK1 and LIMK2 (for review on their function and regulation, see [12,13]). Three isoforms have been described for LIMK2: LIMK2-2a, LIMK2-2b and LIMK2-1. LIMK2-2a and 2b differ by their N-terminal domain while LIMK2-1 differs from LIMK2-2b by the presence of an extra Protein Phosphatase 1 inhibitory domain (PP1i) at its C-terminal extremity. LIMK2-1 has only been poorly characterized but new data have demonstrated that it is primate-specific and that it expressed in human brain [14]. LIMKs have been shown to be effectors of Rho GTPases pathways in different types of cells including neurons. Once activated, LIMKs phosphorylate members of the ADF/cofilin family (comprising ADF, cofilin 1 and 2) and inactivate them, preventing these actin depolymerization factors from severing filamentous actin and allowing accumulation of actin microfilaments [15]. ADF/cofilin are all mainly controlled by LIMKs and Slingshot phosphatases (SSH) through phosphorylation (inactivation) and dephosphorylation (activation)

* Corresponding author at: CNRS UPR 4301, CBM, Orléans, France.

¹ These authors contributed equally to this work.

on their serine 3, respectively [16,17]. SSH family includes three members: SSH1, SSH2 and SSH3 [18]. Cofilin 1 (referred as non-muscle cofilin) and ADF have been involved in neurological functions [19,20]. In this review, we refer to these two proteins as cofilin. Cofilin modulates actin dynamics in a complex and concentration-dependent manner. When in a molar ratio to actin, cofilin severs filaments and accelerates the release of actin monomers from the pointed ends of actin filaments, thereby promoting F-actin disassembly. At higher concentration, such as in dendritic spine during LTP [21], cofilin has been shown to increase the polymerization by nucleating new actin filaments [22–24]. More recently, it was shown, by an *in vitro* system, that cofilin depolymerizes Arp2/3 branches of actin and contributes to full actin depolymerization in combination with Aip1 [25].

LIMKs are also known to regulate MTs stability. They have been shown to play a role in astral microtubule arrangement, centrosome integrity and spindle orientation in HeLa cells [26] and LIMK2 has been shown to be involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs [27]. However, the role of LIMKs has not been demonstrated yet on the neuronal microtubule network. This is the reason why, in this review, we will focus on the roles of LIM kinases in neuronal function and dysfunction through their regulation of cofilin and actin dynamics. We also highlight new data suggesting that LIMKs may be involved in cofilin-independent pathways to play their role in the central nervous system. We clearly distinguish data concerning LIMK1, LIMK2 or both of them because several pieces of evidence concerning LIMKs expression and regulation suggest that the two proteins most probably play distinct roles.

2. Neuronal functions

2.1. Neurodevelopment

The establishment of neuronal networks is a complex process which depends on the precise control of neuronal migration, growth cone motility, axon guidance and neurite outgrowth during the early stages of neurodevelopment. Rho GTPases and their upstream and downstream effectors are involved in these mechanisms [28–30]. A fine regulation between phospho-cofilin and cofilin level by LIMKs and SSHs seems to determine the fate of neuronal cells. Many pathways appear to be involved in this regulation (Fig. 1). Many studies showed more specifically a role of LIM kinases in the regulation of cofilin phosphorylation and actin polymerization in growth cone motility, neurite outgrowth and axon guidance. LIMK2 has also been shown to play a role in neuronal migration.

Two main fields depicting the role of LIMKs in neurodevelopment have been investigated: (i) cofilin phosphorylation regulation by LIMKs, (ii) direct role of LIMKs.

2.1.1. Regulation of phospho-cofilin level

Regulation of the balance between phosphorylated and non-phosphorylated cofilin is essential in growth cone actin dynamics [19]. Cofilin and its two regulators LIMK1 and Slingshot (SSH) are highly concentrated in neuronal growth cone [31–34]. In 1998, Meberg et al. [35] demonstrated that cofilin phosphorylation and dephosphorylation is a significant response to signaling pathways that regulate actin dynamics and alter cell morphology and neurite outgrowth. Indeed, they showed that signals decreasing phosphorylated cofilin level in neurons (NGF, insulin, etc.) are associated with increased process extension while agents increasing phospho-cofilin levels (lysophosphatidic acid) inhibited process extension.

Cofilin is also associated to the signalization and the remodeling of neuritic morphology dependent on semaphorin proteins.

Semaphorins 3A, 3D, 4D (also called collapsins) are secreted proteins that can cause growth cone collapse and either promote repulsive axon guidance [36] or be attractive agents stimulating the growth of apical dendrites [37]. Their effects are mediated by a variety of receptor complexes including members of neuropilin and plexin protein families. The binding of Sema3A to its receptor, a plexin-neuropilin-1 complex [36,38] has been reported to induce growth cone collapse in dorsal root ganglia (DRG) neurons [39]. To evaluate the involvement of cofilin phosphorylation in this process, Aizawa et al. [40] designed a synthetic peptide, S3-peptide, that contains the unique phosphorylation site of cofilin (Ser3) and acts as a competitive inhibitor for cofilin-kinases. Several cofilin-kinases have been reported including Testis-Specific Protein Kinase 1 TESK1 [41] and TESK2 [42], predominantly expressed in testis and prostate and NIK-Like Embryo-Specific Kinase NESK [43], predominantly expressed in skeletal muscles during the late stage of mouse embryogenesis, while LIMK1 is predominantly expressed in the nervous system. S3-peptide was shown to inhibit, in a dose-dependent manner, cofilin phosphorylation induced by a constitutively active LIM-kinase (CA-LIM kinases) [44]. This S3 peptide has been used in many other studies as a tool to observe the impact of reduced cofilin phosphorylation and therefore inactivation. By extension, S3 has been used as an effective competitive inhibitor of LIMK1 [40,45–47]. Using this peptide, Aizawa et al. demonstrated that phosphorylation of cofilin was necessary for Sema 3A-induced growth cone collapse.

Further studies confirmed and complemented these results. First, overexpression of cofilin has been involved in increased neurite length in rat cortical neurons and chicken spinal cord neurons [48]. Second, by overexpressing either cofilin, cofilin-S3A, which is a constitutively active form of cofilin, or cofilin-S3D, which mimics the phosphorylated form of cofilin, Endo et al. [32] showed that cofilin is involved in growth cone motility and neurite outgrowth and that this action is inhibited by phosphorylation on its Ser3.

2.1.2. Role of LIMKs

Other studies have more directly focused on the role of LIMKs in neurodevelopment.

2.1.2.1. In semaphorin pathway in DRG neurons. After demonstrating the requirement for cofilin phosphorylation in the Sema3A-induced growth cone collapse, Aizawa et al. used constitutively active LIMK1 to show that activation of LIMK1 was necessary for Sema3A induced growth cone collapse and neurite retraction. However, this activation was not sufficient since the morphological structure of the growth cone was affected in these conditions but not as collapsed as with Sema3A. Reactivation of the inactive phosphorylated cofilin by a phosphatase was suspected to occur in order to allow a complete growth cone collapse.

2.1.2.2. In chicken DRG neurons and PC12 cells. By overexpressing LIMK1 or SSH1 in DRG neurons and monitoring live imaging of growth cones by time-lapse video fluorescence microscopy, Endo et al. showed that LIMK1 represses growth cone motility and neurite extension whereas SSH1 enhanced these processes. In PC12 cells, Endo et al. [45] further showed that silencing of LIMKs as well as silencing of SSH suppressed the NGF-induced neurite extension from these cells. Therefore, the balance between LIMK-mediated phosphorylation and SSH-mediated dephosphorylation of cofilin is important for growth cone motility and neurite extension.

2.1.2.3. In Nogo-A pathway. Nogo-A is a neurite outgrowth inhibitor in the adult CNS after injury and it regulates progressive restriction of plasticity during development. In the adult CNS, the bulk of NogoA is found in oligodendrocytes and myelin but NogoA persists in neurons of the hippocampus and olfactory system. Neurite

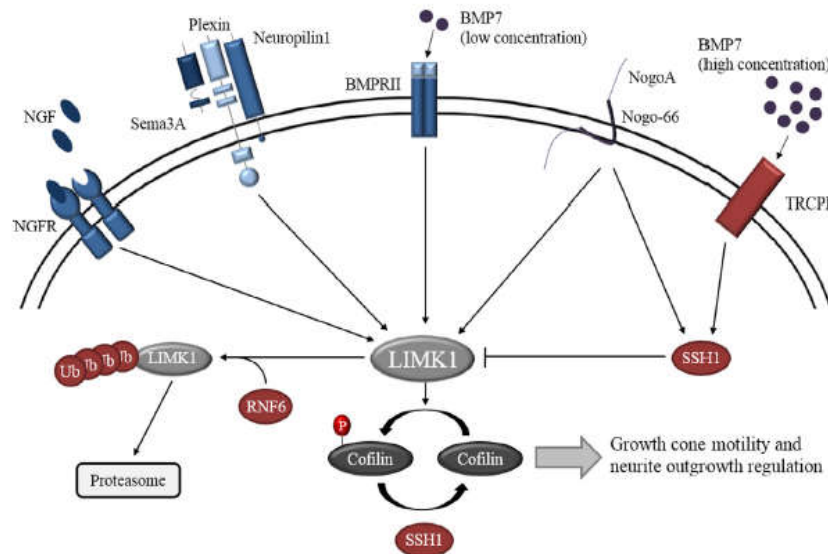


Fig. 1. LIMK1 regulation in growth cone motility and neurite outgrowth. Five different receptor pathways converge to LIMK1 activity during neurodevelopment.

outgrowth inhibitor (Nogo)-66, a potent inhibitor fragment of Nogo-A [49], has been shown to provide an additional degree of cofilin regulation in growth cone and neurites of DRG neurons by rapidly activating LIMK1 (30 s after Nogo stimulation), thereby inhibiting cofilin by phosphorylation, but also SSH1 (10 min after Nogo stimulation) to mediate cofilin dephosphorylation and reactivation. This double activation may play a role in the maintenance of an inhibited neuronal phenotype in response to a myelin associated inhibitor (MAI) such as Nogo A [50,51]. Since LIMK1 has been shown to be a SSH1 substrate [52], activated SSH1 may dephosphorylate and inactivate LIMK1 within 60 min upon Nogo treatment, what might constitute a feedback loop in LIMK1 action on cofilin phosphorylation and on neurite outgrowth in addition to the SSH1 direct role on cofilin dephosphorylation [50].

2.1.2.4. Importance of LIMK1 stability. Other studies showed a reverse role of LIMK1 on neurite outgrowth. In fact, the effect of LIMK1 on neurite outgrowth may depend on the duration of its expression. In mice, transient overexpression of LIMK1 accelerates axon formation whereas long-term overexpression of LIMK1 leads to growth cone collapse and axon retraction [34]. This finding raises the question of how intracellular levels of LIMKs are controlled. Tursun et al. gave insights into this question. They identified a new mode of regulation of cellular LIMK1 concentration by the ubiquitin/proteasome system. They showed that Rnf6 is an ubiquitin ligase that binds to LIMK1 and catalyzes its polyubiquitination, which leads to its degradation [53]. siRNA-mediated inhibition of Rnf6 expression stimulated axon outgrowth.

2.1.2.5. BMPRII pathway. In CNS, another regulation pathway of LIMKs has been described. Type II bone morphogenic protein receptor (BMPRII) has been shown to interact physically with LIMK1 in rat primary cortical neurons. This interaction is specific, as LIMK2 does not interact with BMPRII. BMPRII is a receptor for bone morphogenic proteins (BMP), which belongs to the transforming growth factor- β superfamily. BMPRII is involved in dendrite growth in cultured hippocampal neurons [54] and in sympathetic neurons [55], as well as in synaptic stability in *Drosophila* [56]. Using a dominant negative-form of LIMK1, Lee-Hoeflich

et al. [57] showed that LIMK1 binding to BMPRII regulates BMP dependent dendritogenesis. Wen et al. [58] have further showed that a BMP7 gradient elicits bidirectional responses (attraction and repulsion) of cultured *Xenopus laevis* spinal neuron growth cones. The authors have shown that LIMKs mediate attraction while SSH phosphatases mediate repulsion through the regulation of cofilin phosphorylation. They also demonstrated that the shift from attraction to repulsion results from the emergence of Ca^{2+} signals from a transient receptor potential (TRP) channel, TRPC1, on the growth cone membrane, which activates SSH. BMP7 therefore acts through different LIMK and Ca^{2+} -TRPC1-SSH pathways to control the direction of growth cone steering.

2.1.2.6. Alternative pathways independent of cofilin phosphorylation. Using H19-7 cells, which are immortalized hippocampal progenitors, Yang et al. [59] identified an alternative pathway by which LIMK1 could be involved in neurite outgrowth. H19-7 cells stimulation by neurogenic bFGF induced a specific binding between LIMK1 and CREB (cAMP element-binding protein), leading to a phosphorylation and subsequent activation of this central transcription factor mediating cAMP responsive genes, which has been involved in cell survival and differentiation as well as in neurodevelopment and synaptic plasticity [60]. Furthermore, an inhibition of endogenous LIMK1 activity resulted in the inhibition of CREB activation and suppressed the neuronal differentiation of H19-7. Recent studies also demonstrated CREB implication in LIMK1-mediated regulation of long-term memory and synaptic plasticity [46]. These data suggest that LIMK1 may be involved in a cofilin-independent pathway. Interestingly, another substrate for LIMK1 has been described in dopaminergic neurons. Sacchetti et al. [61] demonstrated that LIMK1 inhibits NURR1 transcription activity. NURR1 is a crucial transcription factor for dopamine-synthesizing neurons that acts as a point of convergence of multiple signaling pathways and that may be involved in differentiation and phenotypic expression of dopaminergic neurons.

Overexpression of the N-terminal non-catalytic regions of LIMK1 in differentiating PC12 cells has been shown to inhibit neurite outgrowth while the C-terminal catalytic kinase domain alone had no effect [62]. These results do not necessarily show the

existence of alternative pathways for LIMK1. Indeed, the kinase domain of LIMK1 appears to require the N-terminal domain to exert its functions in vivo. But, the role of the N-terminal domain of LIMK1 alone could be explained by an interference with the binding of the endogenous LIMK1 protein with signaling complexes that regulate LIMK1 activity. Intriguingly, and along the same line, overexpression of LIMK2d (a LIMK2 isoform lacking the kinase domain) in NSC-34 cells led to a significant increase in neurite length [63].

2.1.2.7. Role of LIMK1 in neuron migration. LIMK1 has been involved in cell migration in cancer [13,64,65] and a similar role in neurons seems plausible. To date, there is only one study mentioning an impact of LIMK2 in neuronal migration, although other members of the Rho GTPase pathway have been involved in this process [66]. Andrews et al. showed that LIMK2 expression is higher in subpallium compared to cortex suggesting it may play a role in the migration of interneurons through the subpallium. They demonstrated that the chemorepulsive action of Sema3A on migrating interneurons required LIMK2 and PlexinA1. They also showed that the interneurons became insensitive to the chemorepulsive action of Sema3A in the absence of LIMK2, resulting in their aberrant migration through the striatum [67].

2.1.2.8. Cell death. Cell death is a very important phenomenon in the development of the nervous system. It is estimated that half of the original cell population produced during nervous system development is eliminated by apoptosis to optimize synaptic connections and remove unnecessary neurons. Recently, Koch et al. [68] have shown that in rat retinal ganglion cells (RGC), ROCK2 has a major role in the regulation of neuronal survival while LIMK1 play no role in this process. Role of LIMK2 has not been studied in survival of RGC. Although LIMK2 protein has recently been involved in neuronal death associated to status epilepticus (see Section 2.3) [69], this function appears to take place only in specific conditions and is not a general process.

The action of cofilin on actin is complex and depends on its concentration [22,23]. A spatio-temporal regulation of cofilin activity is thus important for the establishment of proper membrane protrusions and the establishment of functional neuronal networks. This is controlled at least in part by the LIMKs regulation, since a transient overexpression of LIMK1 has opposite effects to those of a long-term overexpression on neurite outgrowth [34]. Cofilin phosphorylation is also regulated by the SSH phosphatases, which have an impact on actin polymerization and neurodevelopment [17,45,58]. The interplay between cofilin phosphorylation and dephosphorylation and the balance between these two states is important to allow growth cone motility and neurite outgrowth to be a dynamic process. A distinct time course of activation has been demonstrated between LIMK1 and LIMK2 [45]. Therefore, although LIMK2 also regulates cofilin phosphorylation, it might play different roles in growth cone motility and neurite outgrowth. Further studies are essential to better understand the potential different roles of LIMK1 and LIMK2 in regulation of these processes.

2.2. Synaptic plasticity

During neurodevelopment, neurons connect with each other at synapses to form a complex network. Most excitatory synapses in mammals are formed at tiny dendritic protrusions called dendritic spines [70]. The role of these structures is to compartmentalize local signalization and restrict diffusion of synaptic molecules [71,72]. The structure of the dendritic spines is critical for the function of the brain. Abnormalities have been observed in several neurological or neuropsychiatric disorders such as intellectual disability (ID), schizophrenia (SCZ), Alzheimer's disease (AD) and

Parkinson's disease (PD) [73,74]. Recent evidence showed that regulation of the actin cytoskeleton plays a major role in the formation, maturation and plasticity of dendritic spines, and subsequently in learning and memory [4]. Spine enlargement has been shown to depend on actin-F assembly and stabilization whereas spine shrinkage has been associated with actin-F disassembly [75–78].

Several beams of evidence suggest a role of LIMKs in synaptic plasticity.

2.2.1. Data from knockout mice

The most striking data concerning the implication of LIMK1 in synaptic plasticity arise from Meng et al. who generated and studied *Limk1* knockout mice. These mice exhibit a significant decrease in cofilin phosphorylation. Cluster accumulation of actin filaments was observed along dendrites. Dendritic spines in brain sections had thick necks and relatively small heads, instead of normal thin necks and relatively large heads. The same abnormalities were also observed in cultured neurons.

Electrophysiological recordings in the hippocampus CA1 region showed an enhanced early-phase long-term potentiation (E-LTP), highlighting a role of LIMK1 in postsynaptic functions. A role in presynaptic functions was also suggested, since *Limk1* knockout mice exhibited an enhanced synaptic depression and an increased rate of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs), which correspond to neurotransmitter release. Cofilin has also been involved in vesicles exocytosis since in mutant mice lacking ADF and cofilin, synaptic vesicle exocytosis has been shown to be enhanced [79,80]. Furthermore, inactivation of regulators such as RhoB, ROCK2, PAK or LIMK1, which regulate cofilin phosphorylation, impaired vesicle exocytosis [81–84]. *Limk1* knockout mice also showed increased locomotor activity, an enhanced fear response and impairments in spatial learning. It is interesting to note that hyperactivity and weakness in visuospatial learning are observed in Williams–Beuren syndrome (WBS) [83,85] (see below).

Meng et al. [86] further examined the role of LIMK2. They showed that phosphorylated cofilin was not decreased in *Limk2* knockout mice compared to wild-type mice in the hippocampus. However, phosphorylated cofilin was lower in *Limk1/Limk2* double knockout mice than in unique *Limk1* knockout mice, suggesting a synergic role of both kinases in cofilin phosphorylation. On the other hand, the authors showed no difference in enhanced E-LTP between *Limk1* knockout mice and *Limk1/Limk2* double knockout mice in hippocampal CA1 synapses [86]. Compared to LIMK2, the level of LIMK1 expression is higher in the mice cortex [87], suggesting that the quantitative effect of LIMK1 in synaptic plasticity in the adult mouse brain is greater than that of LIMK2.

These studies strongly suggest an involvement of LIMK1 in synaptic plasticity through its regulation of cofilin. The involvement of LIMK2 seems logical but no data clearly demonstrates it until now. As LIMK2 is less expressed in mice brain, its role seems to be less predominant although it does seem to synergically regulate phospho-cofilin level with LIMK1.

LIMK1 has been shown to act on a cofilin-independent pathway through CREB activation (see previous neurodevelopment paragraph) and LIMK1 also plays a role in synaptic plasticity through this pathway [59]. Indeed, Todorovski et al. [46] showed that *Limk1* knockout mice exhibited impairment of long-term memory (LTM). They also performed electrophysiological recordings in the CA1 region of the hippocampus and revealed impairment of late-phase long-term potentiation (L-LTP), a form of long-lasting synaptic plasticity required for the formation of LTM. They used a phosphorylated (pS3) or non-phosphorylated S3-peptide, which increases and decreases cofilin phosphorylation, respectively [47,81], to compensate for the absence of LIMK1 and showed that

L-LTP and LTM regulation was independent of cofilin phosphorylation. In contrast, these deficits were rescued by increasing the activity of CREB [46] thereby demonstrating the implication of the LIMK1-CREB pathway in synaptic plasticity.

2.2.2. Data using a miR approach

Another study emphasizes the direct role of LIMK1 in synaptic plasticity by using a miR approach. As many proteins, LIMK1 has been shown to be regulated by a microRNA (miR134) [88]. miR are non-coding RNA that modulate the translation of specific mRNA [89,90]. miR134 acts as a negative regulator of dendritic spine volume in hippocampal neurons [88]. The authors demonstrated that *Limk1* mRNA interacts with miR134 in vitro and that they co-localize in dendritic spines in vivo. Furthermore, they showed that in the absence of synaptic activity, miR134 inhibits *Limk1* mRNA translation. To determine whether this miR134-mediated repression of *Limk1* mRNA translation is involved in dendritic spine regulation, the authors expressed together in hippocampal neurons miR134 and wild-type *Limk1* mRNA or mutant m191 *Limk1* mRNA, which lacks the interaction domain with miR134. With wild-type *Limk1* mRNA, they observed a decrease in dendritic spine volume whereas with mutant m191 *Limk1* mRNA, the spine volume decrease imposed by miR134 expression was rescued. These results strongly suggest that LIMK1 is a downstream effector of miR134 in the control of the dendritic spine development [88]. The authors further showed that upon synaptic stimulation, the release of BDNF partially relieved the miR134-dependent repression of *Limk1* mRNA translation. The partial repression of *Limk1* mRNA translation strongly suggests that neurotrophic factors or neurotransmitter release might influence synaptic development and neuronal plasticity by this type of mechanism.

2.2.3. Other more indirect data

More indirect data arise from studies of effectors, targets or regulators of LIMKs.

Upstream from LIMKs, Rac1, Cdc42 and RhoA have all been involved in the development and maintenance of dendritic structure, including spine [91–93]. The genetic ablation of PAK1 and PAK3 has also been shown to increase cofilin activity, as well as to alter spine morphology and density, and to impair synaptic plasticity [81,94]. However, Rac and Rho appeared to play diverse functions in regulating dendritic spines. Nakayama et al. showed, by maturing pyramidal neurons in rat hippocampal slice cultures with dominant GTPase mutants, that Rac1 is required for the maintenance of dendritic spines whereas elevation of RhoA activity leads to profound simplification of dendritic trees. Using the same system, Tashiro et al. proposed a model in which Rac1 promotes spine formation while RhoA prevents it thereby attributing antagonistic roles to these GTPases in the control of spine maintenance in pyramidal neurons. Later, by studying LTP consolidation in rat hippocampal slices, Rex et al. showed that LTP induction needs independent signaling cascades: the RhoA/ROCK pathway leads to actin polymerization whereas the Rac/PAK pathway stabilizes the newly formed filaments [95].

In hippocampal neurons, the activation of EphB receptors has been shown to upregulate RhoA activity [96] and to be involved in cofilin-mediated dendritic spine remodeling. A further study indicates that this regulation of dendritic spines through cofilin activity at least partially depends on the activation of ROCK and LIMK1 [97].

More recently, McNair et al. investigated the consequence of RhoB gene deletion on synaptic plasticity. They demonstrated that early-phase long-term potentiation (LTP) was significantly reduced while dendritic spines morphology was altered in RhoB^{-/-} mice. They also observed a decrease of phosphorylated LIMKs in the

hippocampus, suggesting a regulation of these proteins by RhoB in the CNS [82].

Downstream from LIMKs, cofilin also has been shown to be involved in synaptic plasticity. Indeed, overexpression of a constitutively inactive form of cofilin in hippocampal cultures leads to the formation of more mature spines and elevated spine density [98,99] whereas overexpression of a constitutively active form of cofilin induces the formation of immature spines [97,100].

Since LIMK proteins activation is controlled by the Rho GTPase family members, ROCK and PAK proteins. Since cofilin is their target, these data strongly further argue in favor of an implication of LIMKs in synaptic plasticity.

2.3. Neuronal death induced by status epilepticus (SE)

There are two main types of cell death: apoptosis and necrosis. Apoptosis is a highly regulated process and necrosis is a form of unregulated and passive cell death. Neuronal death induced by status epilepticus (SE) is morphologically closer to necrosis than to apoptosis but is a form of programmed death, as apoptosis [101–103].

Kim et al. investigated the molecular causes of SE [69]. They reported an increase in Cyclin D1-CDK4 complex expression following SE. Cyclin D1 and CDK4 form a complex that inactivates retinoblastoma protein (Rb). This inactivation leads to the activation of E2 promoter-binding factor (E2F) which induces the expression of various transcription factors involved in the cell cycle [104]. In post-mitotic neurons and in some pathological conditions, upregulation of the cyclin D1-CDK4 complex increases the transcription of proapoptotic molecules [105,106]. Kim et al. observed that the formation of cyclin D1-CDK4 complex leads to overexpression of LIMK2, followed by necrotic degeneration in rat CA1 neurons. Interestingly, they showed that this process is independent of cofilin phosphorylation. Previous studies showed that LIMK2 can suppress cyclin D1 expression [107]. This may be a negative feedback control following cyclin D1-CDK4 formation. Kim et al. went further into the molecular mechanism of the cyclin D1-CDK4-LIMK2-induced neuronal death by showing that SE lead to a decrease in DRP1 expression. Dynamin-related protein 1 (DRP1) is an essential mitochondrial fission protein [108]. It has been shown that an hyperstabilization of F-actin inhibited the interaction between DRP1 and mitochondria, leading to mitochondria elongation and then to neurotoxicity [109]. Using LIMK2 siRNA, Lim et al. showed that the absence of LIMK2 prevented a decrease of DRP1 expression as well as mitochondrial elongation induced by SE. These data suggest that LIMK2 downregulates DRP1 expression, which leads to neuronal death through dysfunction of mitochondrial fission [117].

3. Neuronal diseases

LIMK proteins have been shown to be involved in many neuronal diseases. This attests the importance of their function in the development of a functional and optimal neuronal network.

3.1. Neuroectodermic genetic disease: neurofibromatosis type 1 (NF1)

NF1 is an autosomal dominant disease caused by mutations in the neurofibromin gene (*NF1*), encoding neurofibromin (Nf1). This disease is characterized by tumors developing in the peripheral or central nervous system, with an increased risk of malignancy [110], and cognitive dysfunctions such as learning disabilities [111]. NF1 is highly expressed in the nervous system [112] and acts as a tumor suppressor. Sequence analysis of NF1 has revealed five domains: a cysteine/serine-rich domain (CSRD) included in the

N-terminal domain, a Ras GTPase activating protein (GAP)-related domain (GRD), a Sec14-Pleckstrin homology domain (SecPH), a Gdp Binding domain (GBD) included in the HLR (HEAT-Like Repeat) domain and a C-terminal domain (CTD). The N-terminal domain affects cell adhesion and migration by negatively regulating the Rac1/Pak1/LIMK1/cofilin pathway [113]. However, the molecular mechanisms involved in this regulation are unknown. The parallel Rho/ROCK/LIMK2/cofilin pathway is also connected to neurofibromatosis. Indeed, depletion of Nf1 activates this pathway, affecting actin cytoskeleton reorganization and cell motility [114]. The molecular mechanisms involved in this process have been revealed: the SecPH domain of Nf1 interacts with LIMK2, inhibiting its phosphorylation and subsequent activation by ROCK [115]. Therefore, Nf1 plays a dual role on cofilin phosphorylation and actin cytoskeleton dynamics by inhibiting the two parallel pathways regulating these processes (Fig. 2). When Nf1 is mutated, these two pathways are misregulated thereby affecting neuronal development and synaptic plasticity as described above, and that might be the cause of cognitive deficits associated to the disease. Furthermore, these two pathways are also involved in the progression of various cancers toward invasive and metastatic stages [12] and their dysregulation might contribute to the development of tumors (neurofibroma, glioma, pheochromocytoma...) associated to the disease.

3.2. Neurodevelopmental disorders

Neurodevelopmental disorders are due to anomalies that occur during central nervous system development. In several cases, these syndromes are caused by genetic abnormalities, leading to the synthesis of a non-functional or dysfunctional protein.

LIM kinases are involved in three neurodevelopmental diseases: non-syndromic intellectual disability (ID), Williams–Beuren syndrome (WBS), and schizophrenia (SZC).

3.2.1. Intellectual disability (ID)

ID is defined by impairment in cognitive abilities impacting on adaptive functioning in three domains that determine ability to manage everyday tasks. It is evaluated by an IQ score below 70, with further classification distinguishing mild ($69 < IQ < 50$), moderate ($49 < IQ < 35$), severe ($34 < IQ < 20$) and profound ($IQ < 20$) ID. These symptoms must begin during the developmental period [116]. ID is categorized as non-syndromic when the intellectual level is the only clinical manifestation, or as syndromic, when it is associated with other anomalies such as dysmorphic features or metabolic defects.

As described above, LIM kinases are involved in neurite outgrowth and dendritic spine morphogenesis. *LIMK2* transcription results in the generation of three sets of mRNAs in Humans. *LIMK2-1* encodes a primate-specific protein that possesses a supplementary PPIi domain at the carboxy-terminal extremity. The PPIi domain sequence was recently analyzed in a group of patients with non-syndromic ID. Sequencing showed a rare missense mutation, p.S668P, significantly associated with the disease. Furthermore, functional studies showed that, when compared to *LIMK2-2b*, *LIMK2-1* inhibits neurite outgrowth, and that the p.S668P mutation abolished this effect [14].

3.2.2. Williams–Beuren syndrome (WBS)

WBS is a contiguous gene deletion syndrome caused by a hemizygous deletion of 1.5–1.8 Mb on 7q11.23 [117]. Due to the absence of several genes, phenotypes associated with this deletion are complex and include cardiovascular abnormalities, particular facial features and a specific cognitive profile, which is characterized by IQs ranging from 40 to 100 [118,119], corresponding to mild to moderate ID, and a severe visuospatial construction deficit [120,121]. The cardiovascular abnormalities and some of the

particular facial features have been linked to haploinsufficiency of *elastin (ELN)* [122–124]. Candidate genes have been suggested for cognitive abnormalities and include *LIMK1* and *CLIP2* [125]. *LIMK1* has been implicated by linkage in two families with a partial WBS phenotype, including a WBS cognitive profile. A submicroscopic deletion cosegregated in both families and included the two genes *ELN* and *LIMK1* [126,127]. However, other family with a deletion encompassing *LIMK1* did not display spatial impairments [128]. Reasons for this discrepancy have been discussed [129–131]. *LIMK1* has been suggested to be involved only in visuospatial cognition and may contribute to cognitive deficits if deleted in combination with other genes, such as *CLIP2* [132,133]. It has also been shown that individuals with a small deletion have higher IQ, which might allow them to use alternative strategies to compensate their visuospatial constructive impairment [119]. Interestingly, *Limk1* knock out mice showed altered spatial learning [83], which is relevant with an involvement of *LIMK1* in visuospatial construction deficit. *Limk1* knockout mice also showed abnormalities in synaptic structure and dendritic spine development [83]. To date, it remains unclear if these abnormalities can be observed in WBS patients and if they contribute to the cognitive profile [125].

3.2.3. Schizophrenia (SZC)

A recent study has also suggested a role for *LIMK2* in SZC. SZC is a mental disorder with onset in early adulthood, and mainly characterized by distorted thoughts and perceptions, and inappropriate or blunted affective responses. Intellectual capacities are usually maintained although certain cognitive disorders may appear [134]. Genis-Mendoza et al. studied gene expression profiles in a neonatal ventral-hippocampal lesion rat model, a well-established model of schizophrenia [135,136]. The juvenile rat group showed overexpression of *LIMK2* in the nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus [137]. Otherwise, transcript level of the Rho GTPases *Cdc42* has been found to be lower in the dorso-lateral prefrontal cortex of subjects with SZC [138]. This data lead to the examination of *Cdc42*-related gene expression in patients with SZC compared to controls. The study showed an increase in both *LIMK1* and *LIMK2* expression in the dorso-lateral prefrontal cortex [139].

3.3. Neurodegenerative diseases

3.3.1. Alzheimer's disease (AD)

AD is a neurodegenerative disease characterized by cognitive decline, loss of memory and learning abilities, loss of independence, and shorter survival [140]. Two types of lesions appear in AD: neurofibrillary tangles and senile plaques, mainly consisting in extracellular amyloid β deposits ($A\beta$) [141]. In AD, deposition of $A\beta$ fibrils promotes a pathological rearrangement of the extracellular matrix and the formation of aberrant focal adhesion structures which result in a pathological mechanism of neuroplasticity [142]. The results of Heredia et al. strongly suggest a role of *LIMK1* activation in AD pathology. First of all, they showed that treatment of rat hippocampal neurons with high levels of fibrillar $A\beta$ ($fA\beta$) induced *LIMK1*-mediated cofilin phosphorylation and subsequent increase in F-actin concentrations accompanied by neuritic dystrophy and neuronal cell death [143]. Using the cofilin S3-peptide in the same cells, these authors further showed that cofilin phosphorylation locking prevented actin filament remodeling and neuronal degeneration thereby demonstrating the crucial role of *LIMK1* in $A\beta$ -induced neuritic dystrophy.

However, low doses of $A\beta$ can also promote cofilin activation and formation of cofilin-actin rods [144], features that are involved in neurodegenerative diseases [145]. Thus, distinct mechanisms affecting cofilin could be involved in neuronal degeneration in AD. Heredia et al. also showed in brain of patients that increased levels

of phosphorylated LIMK1 have been found in brain areas affected with AD pathology i.e. the neurons of the entorhinal cortex and hippocampus. In late AD, when membrane integrity of neurons is not preserved anymore, there is less phosphorylated LIMK1. This suggests that LIMK1 activation may require the neuronal membrane integrity [143]. Phospho-LIMK1 localization is mostly confined to patches that might correspond to focal-adhesion structures which are actin-based structures providing a structural link between extracellular matrix and cytoskeleton. The existence of a protein complex consisting of LIMK1 and PAK which is recruited by paxillin during focal adhesion activation argues in favor of this hypothesis [146,147]. Interestingly, paxillin positively regulates Rac, an upstream effector of LIMK1, and negatively regulates Rho, an upstream effector of LIMK2. Therefore, in AD progression, A β deposition might induce a focal abnormal activation of LIMK1, PAK1 and Rho-GTPases promoting an alteration of the actin cytoskeleton at focal-adhesion sites and a pathological rearrangement of extracellular matrix. The high amount of paxillin and focal adhesion proteins in senile plaques in human AD [148] are in favor of this hypothesis.

LIMK1 may also be involved in neuron degeneration through a mechanism similar to that involving morphogens such as semaphorin 3A and BMP7 which is observed during neurodevelopment [40,58]. In normal conditions, these mechanisms are temporally and spatially regulated but this is not the case in AD and this might promote a pathological mechanism of plasticity.

LIMK2 seems also to be involved in AD. Injection of streptozotocin (STZ) in rats leads to inhibition of the neuronal insulin receptor and has been shown to be a model of AD [149]. STZ injection induces increased levels of phosphorylated LIMK2, leading to degeneration of synaptic structures, followed by learning and memory disorders. This effect is abolished by injection of fasudil hydrochloride (FH), a ROCK inhibitor [150].

3.3.2. Parkinson's disease (PD)

PD is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease. Patients present motor symptoms such as tremor at rest, rigidity, akinesia (or bradykinesia) and postural instability [151]. These symptoms result from progressive loss of dopaminergic neurons, mostly in the substantia nigra pars compacta and the development of inclusion bodies termed "Lewy bodies" (LB) in the SNC [152].

Most early-onset familial PD is caused by mutations in the Parkin (*PARK2*) gene which encodes the Parkin protein [153–155]. In patients with PD, Parkin mutations are associated with loss of neurons in the CNS and locus coeruleus, without development of LB [156]. Parkin mRNA has been shown to have a protective role in cell survival and proliferation. PARKIN functions as an ubiquitin E3 ligase and catalyzes ubiquitin binding to dysfunctional proteins for degradation [157–159].

In 2007, Lim et al. showed, by co-immunoprecipitation experiments, that Parkin interacts with LIMK1. They also highlighted an interaction between LIMK2 and Parkin which was not further investigated. In fact, Parkin ubiquitinates LIMK1 in human dopaminergic neuronal BE(2)-M17 cells but not in HEK cells, suggesting a tissue-specific regulation. Furthermore, Parkin reduces LIMK1-induced cofilin phosphorylation and accumulation of actin filaments [160]. These findings support previous studies that showed a role for Parkin in actin stabilization [161]. Parkin mutations may contribute to cytoskeleton defects and impaired vesicle transport through its action on LIMK1 [161–163].

4. Conclusion

LIM kinases (LIMK1 and LIMK2) are known to phosphorylate and subsequently inactivate cofilin. SSH, LIM kinases counterparts,

dephosphorylate cofilin thereby reactivating it. The balance between phospho-cofilin and cofilin seems crucial for actin dynamics and to regulate many processes, especially neuronal functions. Many studies reviewed here have shown the importance of this mechanism in actin dynamics and in several key neuronal functions.

However, new concept arising suggests that LIMKs play roles in the establishment of a functional neuronal network independently of cofilin phosphorylation. Indeed, overexpression of LIMK2d, an isoform lacking the kinase domain, increases neurite length without affecting cofilin phosphorylation [63]. Furthermore, other substrates of LIMKs have been identified in the CNS [59,61]. One of these, CREB, has recently been reported to be involved in L-LTP and LTM in mice through its activation by LIMK1 [46]. In addition, LIMK1 has been shown to inhibit NURR1 in dopaminergic neurons what could influence their differentiation [61]. These pathways highlighted a potential nuclear role of LIMK1. Moreover, the LIMK2-1 isoform could also play supplementary roles through its PP1i domain. Indeed a missense mutation in this region has been found to be associated with intellectual disability [14]. The precise molecular mechanisms involved in these cofilin independent functions remain to be characterized.

The remaining question is whether LIMKs have distinct roles in the CNS or whether they are redundant? It is difficult to answer this question because many studies examined the role of only one LIMK and not the other one on cofilin phosphorylation, actin dynamics and cellular morphological changes. Most of the studies have focused on LIMK1 which was first discovered. Much less data are available concerning LIMK2. However, several pieces of evidence suggest that the two proteins, although they both phosphorylate cofilin, may play different roles in particular in the CNS.

Indeed, *Limk2* KO mice are only mildly affected whereas *Limk1/Limk2* double KO are profoundly altered in cofilin phosphorylation and hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity [86]. The explanation for this is not necessarily a difference in the molecular function of the two LIMKs but it could arise from differences in the regulation of protein expression and activity. Indeed, LIMK proteins are expressed in different tissues, their expression is differently regulated, they are activated by different signaling pathways and their activity is regulated in different ways. At first, LIMK2 is ubiquitously expressed whereas LIMK1 is mostly expressed in CNS [164,165]. Furthermore, the time course of LIMK1 and LIMK2 activation differs. Indeed, in PC12 cells, LIMK1 was shown to be activated within 2 min and then reverted to the basal level in 30 min while LIMK2 activity increased gradually up to 30 min after NGF stimulation which may have important consequences on the activation of cofilin. In addition, recent studies showed that LIMK upstream regulation pathways are partly distinct (Fig. 3). Indeed, both LIMK1 and LIMK2 are regulated by Rho family GTPase pathways and Myotonic Dystrophy Kinase-related Cdc-42-binding kinase α (MRCK) (α) activates both LIMK1 and LIMK2 downstream from Cdc42 [166,167]. But LIMK1 is preferentially activated by the Rac/p-21-activated kinase (PAK1, 2 and 4) pathway [168–171] whereas LIMK2 is preferentially activated by the Rho/Rho-kinase (ROCK1 and 2) pathway [172,173] although ROCK may also phosphorylate LIMK1 when overactivated [174]. Moreover, LIMK1 and LIMK2 activity is regulated by different proteins. For instance, Large tumor suppressor 1 (LATS1) interacts with LIMK1, inhibiting its kinase activity [175], and ubiquitin ligase Rnf6 leads to LIMK1 degradation [53]. But neither LATS1 nor Rnf6 have been shown to act on LIMK2. Par3 has also been shown to bind selectively to LIMK2 and to inactivate its kinase activity [146]. Finally, the SecPH domain of Nf1 has been shown to interact with LIMK2 and not LIMK1 and to prevent its activation by ROCK [115].

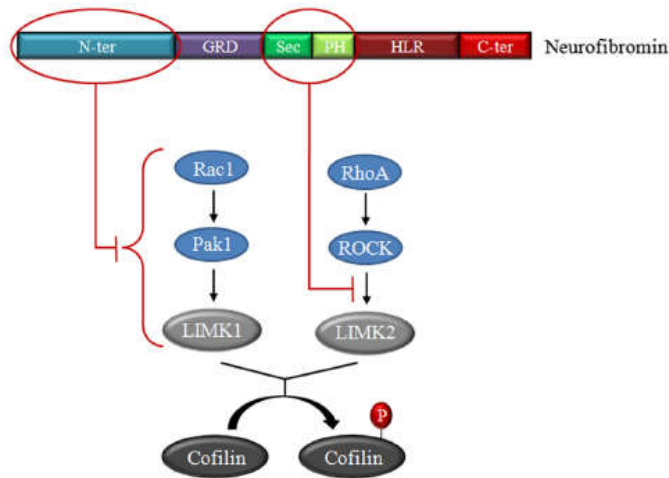


Fig. 2. Regulation of both LIMK by Neurofibromin. The CSRD domain inhibits the Rac1/Pak1/LIMK1 pathway. The SecPH domain interacts and consequently inhibits the ROCK-mediated activation of LIMK2. This regulation lead to an increase amount of activated Cofilin and a dysregulation of this pathway may be involved in the clinical presentation of neurofibromatosis type 1.

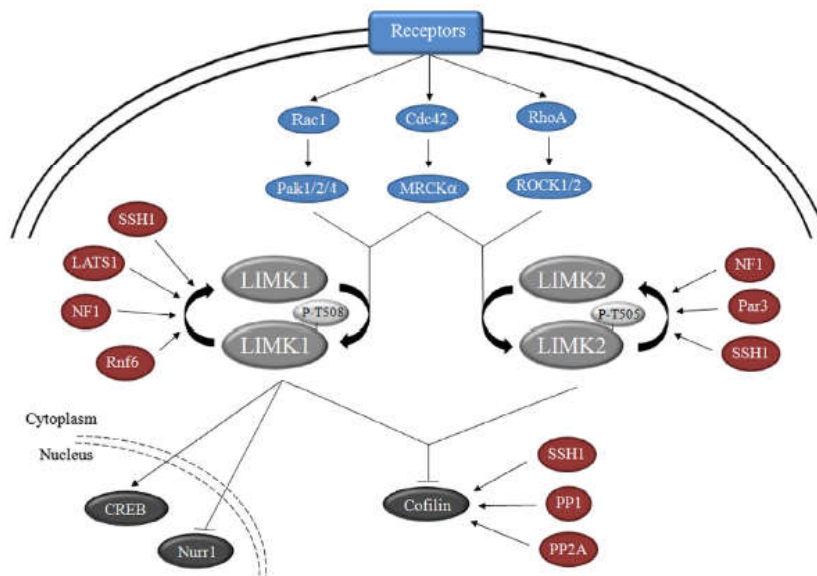


Fig. 3. Lim kinases regulation. LIMK1 and LIMK2 integrate signals from Rho GTPase family signaling pathways. LIMK1 is upregulated by Rac and Cdc42. LIMK2 is upregulated by Cdc42 and RhoA. They are deactivated by common molecules such as NF1 and different molecules such as LATS1 for LIMK1 and Par3 for LIMK2. Both LIMK1 and LIMK2 phosphorylate and inactivate cofilin, which result in actin polymerization. LIMK1 inactivates Nurr1 and activates CREB. The impact of LIMK2 on Nurr1 and CREB has not been studied to date.

Therefore, LIMK1 and LIMK2 may play similar functions at the molecular level but according to differences in regulation of their expression and mode of action, they may exert distinct or complementary functions in the CNS at a more integrated level.

Furthermore, new data suggest that LIMK1 and LIMK2 may play different molecular functions. Indeed, LIMK2d, devoid of its kinase domain and LIMK2-1 with its supplementary PP1i domain might perform functions different from that of LIMK1 or the other LIMK2 isoforms. However, we do not have yet the experimental proof of that.

Further studies are needed to increase our understanding of the differences between LIMK1 and LIMK2. Given the many roles attributed to these proteins in several important physiological

and pathological pathways, an interesting field of investigation would be to design molecules that modulate specifically their activity. These molecules may also be potential therapeutic agents in treating the numerous diseases in which LIMKs are involved.

Acknowledgments

This work was supported by the Région Centre, Ligue Contre le Cancer, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université François Rabelais de Tours, and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- [1] Luo, L. (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 601–635.
- [2] Sheng, M. and Hoogenraad, C.C. (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847.
- [3] Cingolani, L.A. and Goda, Y. (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (5), 344–356.
- [4] Hotulainen, P. and Hoogenraad, C.C. (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* 189 (4), 619–629.
- [5] Renner, M., Specht, C.G. and Triller, A. (2008) Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18 (5), 532–540.
- [6] Schlager, M.A. and Hoogenraad, C.C. (2009) Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol. Brain* 2, 25.
- [7] Kuijpers, M. and Hoogenraad, C.C. (2011) Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Mol. Cell. Neurosci.* 48 (4), 349–358.
- [8] Dehmelt, L. and Halpain, S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6 (1), 204.
- [9] Akhmanova, A. and Steinmetz, M.O. (2010) Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* 123 (Pt 20), 3415–3419.
- [10] Janke, C. and Kneussel, M. (2010) Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* 33 (8), 362–372.
- [11] Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R. and Voyno-Yasenetskaia, T. (2005) LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280 (28), 26533–26542.
- [12] Manetti, F. (2012) LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med. Res. Rev.* 32 (5), 968–998.
- [13] Scott, R.W. and Olson, M.F. (2007) LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 85 (6), 555–568.
- [14] J. Tastet, H. Cuberos, C.R. Andres, A. Toutain, M. Raynaud, S. Marouillat, R.-A. Thepault, F. Laumonier, F. Bonnet-Brihault, B. Vallée, H. Bénédetti, and P. Vourch. Role of a primate specific isoform of LIMK2, LIMK2-1, in neurite outgrowth and its implication in non-syndromic intellectual disability (unpublished work).
- [15] Vartiainen, M.K., Mustonen, T., Mattila, P.K., Ojala, P.J., Thesleff, I., Partanen, J. and Lappalainen, P. (2002) The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13 (1), 183–194.
- [16] Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O. and Caroni, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393 (6687), 805–809.
- [17] Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. and Uemura, T. (2002) Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108 (2), 233–246.
- [18] Ohta, Y., Kousaka, K., Nagata-Ohashi, K., Ohashi, K., Muramoto, A., Shima, Y., Niwa, R., Uemura, T. and Mizuno, K. (2003) Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 8 (10), 811–824.
- [19] Gungabissoon, R.A. and Bamberg, J.R. (2003) Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 51 (4), 411–420.
- [20] Rust, M.B. (2015) ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. *Cell. Mol. Life Sci.*
- [21] Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M. and Hayashi, Y. (2014) Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* 82 (2), 444–459.
- [22] Hild, G., Kalmár, L., Kardos, R., Nyitrai, M. and Bugyi, B. (2014) The other side of the coin: functional and structural versatility of ADF/cofilins. *Eur. J. Cell Biol.* 93 (5–6), 238–251.
- [23] Andrianantoandro, E. and Pollard, T.D. (2006) Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* 24 (1), 13–23.
- [24] Bernstein, B.W. and Bamberg, J.R. (2010) ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* 20 (4), 187–195.
- [25] Gressin, L., Guillotin, A., Guérin, C., Blanchoin, L. and Michelot, A. (2015) Architecture dependence of actin filament network disassembly. *Curr. Biol.* 25 (11), 1437–1447.
- [26] Heng, Y.-W., Lim, H.-H., Mina, T., Utomo, P., Zhong, S., Lim, C.-T. and Koh, C.-G. (2012) TPPP acts downstream of RhoA-ROCK-LIMK2 to regulate astral microtubule organization and spindle orientation. *J. Cell Sci.* 125 (Pt 6), 1579–1590.
- [27] Pouha, S.T., Shum, M.S.Y., Goebel, A., Bernard, O. and Kavallaris, M. (2010) LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* 29 (4), 597–607.
- [28] Dickson, B.J. (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 (1), 103–110.
- [29] Luo, L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1 (3), 173–180.
- [30] Song, H. and Poo, M. (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nat. Cell Biol.* 3 (3), E81–E88.
- [31] Bamberg, J.R. and Bray, D. (1987) Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 105 (6 Pt 1), 2817–2825.
- [32] Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T. and Mizuno, K. (2003) Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (7), 2527–2537.
- [33] Gehler, S., Shaw, A.E., Sarmiere, P.D., Bamberg, J.R. and Letourneau, P.C. (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24 (47), 10741–10749.
- [34] Rosso, S., Bollati, F., Bisbal, M., Peretti, D., Sumi, T., Nakamura, T., Quiroga, S., Ferreira, A. and Cáceres, A. (2004) LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. *Mol. Biol. Cell* 15 (7), 3433–3449.
- [35] Meberg, P.J., Ono, S., Minamide, L.S., Takahashi, M. and Bamberg, J.R. (1998) Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil. Cytoskeleton* 39 (2), 172–190.
- [36] Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H. and Strittmatter, S.M. (1999) Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99 (1), 59–69.
- [37] Polleux, F., Morrow, T. and Ghosh, A. (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404 (6778), 567–573.
- [38] Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G.L., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M.L., Goodman, C.S., Poo, M., Tessier-Lavigne, M. and Comoglio, P.M. (1999) Flexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99 (1), 71–80.
- [39] Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274 (5290), 1123–1133.
- [40] Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y. and Yahara, I. (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat. Neurosci.* 4 (4), 367–373.
- [41] Tushima, J., Tushima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. and Mizuno, K. (2001) Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* 12 (4), 1131–1145.
- [42] Tushima, J., Tushima, J.Y., Takeuchi, K., Mori, R. and Mizuno, K. (2001) Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* 276 (33), 31449–31458.
- [43] Nakano, K., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Moriyama, K., Yazaki, K., Hayashi, Y. and Kitamura, N. (2003) Cofilin phosphorylation and actin polymerization by NRK/NEK, a member of the germinal center kinase family. *Exp. Cell Res.* 287 (2), 219–227.
- [44] Edwards, D.C. and Gill, G.N. (1999) Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274 (16), 11352–11361.
- [45] Endo, M., Ohashi, K. and Mizuno, K. (2007) LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *J. Biol. Chem.* 282 (18), 13692–13702.
- [46] Todorovski, Z., Asrar, S., Liu, J., Saw, N.M.N., Joshi, K., Cortez, M.A., Snead, O.C., Xie, W. and Jia, Z. (2015) LIMK1 regulates long-term memory and synaptic plasticity via the transcriptional factor CREB. *Mol. Cell Biol.*
- [47] Zhou, Z., Hu, J., Passafium, M., Xie, W. and Jia, Z. (2011) GluA2 (GluR2) regulates metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression through N-cadherin-dependent and cofilin-mediated actin reorganization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31 (3), 819–833.
- [48] Meberg, P.J. and Bamberg, J.R. (2000) Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20 (7), 2459–2469.
- [49] GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T. and Strittmatter, S.M. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403 (6768), 439–444.
- [50] Hsieh, S.H.-K., Ferraro, G.B. and Fournier, A.E. (2006) Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26 (3), 1006–1015.
- [51] Montani, L., Gerrits, B., Gehrig, P., Kempf, A., Dimou, L., Wollscheid, B. and Schwab, M.E. (2009) Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system. *J. Biol. Chem.* 284 (16), 10793–10807.
- [52] Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamberg, J.R. and Bernard, O. (2005) Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J.* 24 (3), 473–486.
- [53] Tursun, B., Schlüter, A., Peters, M.A., Viehweger, B., Ostendorff, H.P., Soosairajah, J., Drung, A., Bossenz, M., Johnsen, S.A., Schweizer, M., Bernard, O. and Bach, I. (2005) The ubiquitin ligase Rnf6 regulates local LIM kinase 1 levels in axonal growth cones. *Genes Dev.* 19 (19), 2307–2319.
- [54] Withers, G.S., Higgins, D., Charette, M. and Banker, G. (2000) Bone morphogenetic protein-7 enhances dendritic growth and receptivity to innervation in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12 (1), 106–116.

- [55] Horbinski, C., Stachowiak, E.K., Chandrasekaran, V., Miuzukoshi, E., Higgins, D. and Stachowiak, M.K. (2002) Bone morphogenetic protein-7 stimulates initial dendritic growth in sympathetic neurons through an intracellular fibroblast growth factor signaling pathway. *J. Neurochem.* 80 (1), 54–63.
- [56] Eaton, B.A. and Davis, G.W. (2005) LIM kinase 1 controls synaptic stability downstream of the type II BMP receptor. *Neuron* 47 (5), 695–708.
- [57] Lee-Hoeflich, S.T., Causing, C.G., Podkowa, M., Zhao, X., Wrana, J.L. and Attisano, L. (2004) Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.* 23 (24), 4792–4801.
- [58] Wen, Z., Han, L., Bamburg, J.R., Shim, S., Ming, G. and Zheng, J.Q. (2007) BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *J. Cell Biol.* 178 (1), 107–119.
- [59] Yang, E.J., Yoon, J.-H., Min, D.S. and Chung, K.C. (2004) LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 279 (10), 8903–8910.
- [60] Sakamoto, K., Karelina, K. and Obrietan, K. (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J. Neurochem.* 116 (1), 1–9.
- [61] Sacchetti, P., Carpentier, R., Ségard, P., Olivé-Cren, C. and Lefebvre, P. (2006) Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res.* 34 (19), 5515–5527.
- [62] Birkenfeld, J., Betz, H. and Roth, D. (2001) Inhibition of neurite extension by overexpression of individual domains of LIM kinase 1. *J. Neurochem.* 78 (4), 924–927.
- [63] Tastet, J., Vourch, P., Laumonier, F., Vallée, B., Michelle, C., Duittoz, A., Bénédicti, H. and Andres, C.R. (2012) LIMK2d, a truncated isoform of Lim kinase 2 regulates neurite growth in absence of the LIM kinase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420 (2), 247–252.
- [64] Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O. and Itoh, K. (2003) A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (12), 7247–7252.
- [65] Davila, M., Frost, A.R., Grizzle, W.E. and Chakrabarti, R. (2003) LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 278 (38), 36868–36875.
- [66] Govek, E.-E., Newey, S.E. and Van Aelst, L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19 (1), 1–49.
- [67] Andrews, W.D., Zito, A., Memi, F., Jones, G., Tamamaki, N. and Parnavelas, J.G. (2013) Limk2 mediates semaphorin signalling in cortical interneurons migrating through the subpallium. *Biol. Open* 2 (3), 277–282.
- [68] Koch, J.C., Tonges, L., Barski, E., Michel, U., Bähr, M. and Lingor, P. (2014) ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death Dis.* 5, e1225.
- [69] Kim, J.-E., Ryu, H.J., Kim, M.J. and Kang, T.-C. (2014) LIM kinase-2 induces programmed necrotic neuronal death via dysfunction of DRP1-mediated mitochondrial fission. *Cell Death Differ.* 21 (7), 1036–1049.
- [70] Bourne, J.N. and Harris, K.M. (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47–67.
- [71] Newpher, T.M. and Ehlers, M.D. (2009) Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol.* 19 (5), 218–227.
- [72] Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L. and Svoboda, K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313–353.
- [73] Fiala, J.C., Spacek, J. and Harris, K.M. (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 39 (1), 29–54.
- [74] Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. and Noguchi, J. (2010) Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33 (3), 121–129.
- [75] Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R. and Kasai, H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429 (6993), 761–766.
- [76] Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B. and Bonhoeffer, T. (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44 (5), 759–767.
- [77] Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A. and Hayashi, Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7 (10), 1104–1112.
- [78] Zhou, Q., Homma, K.J. and Poo, M. (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44 (5), 749–757.
- [79] Wolf, M., Zimmermann, A.-M., Görlich, A., Gumiak, C.B., Sassoè-Pognetto, M., Friauf, E., Witke, W. and Rust, M.B. (2014) ADF/cofilin controls synaptic actin dynamics and regulates synaptic vesicle mobilization and exocytosis. *Cereb. Cortex* 1991.
- [80] Zimmermann, A.-M., Jene, T., Wolf, M., Görlich, A., Gumiak, C.B., Sassoè-Pognetto, M., Witke, W., Friauf, E. and Rust, M.B. (2015) Attention-deficit/hyperactivity disorder-like phenotype in a mouse model with impaired actin dynamics. *Biol. Psychiatry* 78 (2), 95–106.
- [81] Huang, W., Zhou, Z., Asrar, S., Henkelman, M., Xie, W. and Jia, Z. (2011) P21-activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties. *Mol. Cell Biol.* 31 (3), 388–403.
- [82] McNair, K., Spike, R., Guilding, C., Prendergast, G.C., Stone, T.W., Cobb, S.R. and Morris, B.J. (2010) A role for RhoB in synaptic plasticity and the regulation of neuronal morphology. *J. Neurosci., Off. J. Soc. Neurosci.* 30 (9), 3508–3517.
- [83] Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L. and Jia, Z. (2002) Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35 (1), 121–133.
- [84] Zhou, Z., Meng, Y., Asrar, S., Todorovski, Z. and Jia, Z. (2009) A critical role of Rho-kinase ROCK2 in the regulation of spine and synaptic function. *Neuropharmacology* 56 (1), 81–89.
- [85] Bellugi, U., Mills, D., Jernigan, T., Hickok, G. and Galaburda, A. (1999) Linking cognition, brain structure, and brain function in Williams syndrome (Tager-Flusberg, H., Ed.), *Neurodevelopmental Disorders*, pp. 111–136, MIT Press.
- [86] Meng, Y., Takahashi, H., Meng, J., Zhang, Y., Lu, G., Asrar, S., Nakamura, T. and Jia, Z. (2004) Regulation of ADF/cofilin phosphorylation and synaptic function by LIM-kinase. *Neuropharmacology* 47 (5), 746–754.
- [87] Mori, T., Okano, I., Mizuno, K., Tohyama, M. and Wanaka, A. (1997) Comparison of tissue distribution of two novel serine/threonine kinase genes containing the LIM motif (LIMK-1 and LIMK-2) in the developing rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 45 (2), 247–254.
- [88] Schratz, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M. and Greenberg, M.E. (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439 (7074), 283–289.
- [89] Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136 (2), 215–233.
- [90] Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9 (2), 102–114.
- [91] Luo, L., Hensch, T.K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1996) Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 379 (6568), 837–840.
- [92] Nakayama, A.Y., Harms, M.B. and Luo, L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci., Off. J. Soc. Neurosci.* 20 (14), 5329–5338.
- [93] Tashiro, A., Minden, A. and Yuste, R. (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex* 10 (10), 927–938.
- [94] Asrar, S., Meng, Y., Zhou, Z., Todorovski, Z., Huang, W.W. and Jia, Z. (2009) Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1). *Neuropharmacology* 56 (1), 73–80.
- [95] Rex, C.S., Chen, L.Y., Sharma, A., Liu, J., Babayan, A.H., Gall, C.M. and Lynch, G. (2009) Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *J. Cell Biol.* 186 (1), 85–97.
- [96] Moeller, M.L., Shi, Y., Reichardt, L.F. and Ethell, I.M. (2006) EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation. *J. Biol. Chem.* 281 (3), 1587–1598.
- [97] Shi, Y., Pontrello, C.G., DeFea, K.A., Reichardt, L.F. and Ethell, I.M. (2009) Focal adhesion kinase acts downstream of EphB receptors to maintain mature dendritic spines by regulating cofilin activity. *J. Neurosci., Off. J. Soc. Neurosci.* 29 (25), 8129–8142.
- [98] Gu, J., Lee, C.W., Fan, Y., Komlos, D., Tang, X., Sun, C., Yu, K., Hartzell, H.C., Chen, G., Bamburg, J.R. and Zheng, J.Q. (2010) ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 13 (10), 1208–1215.
- [99] Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J. and Sabatini, B.L. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci., Off. J. Soc. Neurosci.* 27 (11), 2866–2875.
- [100] Pontrello, C.G., Sun, M.-Y., Lin, A., Fiocco, T.A., DeFea, K.A. and Ethell, I.M. (2012) Cofilin under control of β -arrestin-2 in NMDA-dependent dendritic spine plasticity, long-term depression (LTD), and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (7), E442–E451.
- [101] Ingvar, M., Morgan, P.F. and Auer, R.N. (1988) The nature and timing of excitotoxic neuronal necrosis in the cerebral cortex, hippocampus and thalamus due to flurothyl-induced status epilepticus. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 75 (4), 362–369.
- [102] Olney, J.W., Rhee, V. and Ho, O.L. (1974) Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res.* 77 (3), 507–512.
- [103] Sloviter, R.S., Dean, E., Sollas, A.L. and Goodman, J.H. (1996) Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 366 (3), 516–533.
- [104] Stoica, B.A., Byrnes, K.R. and Faden, A.I. (2009) Cell cycle activation and CNS injury. *Neurotox. Res.* 16 (3), 221–237.
- [105] Greene, L.A., Biswas, S.C. and Liu, D.X. (2004) Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ.* 11 (1), 49–60.
- [106] Nguyen, M.D., Boudreau, M., Kriz, J., Couillard-Després, S., Kaplan, D.R. and Julien, J.-P. (2003) Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J. Neurosci., Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (6), 2131–2140.
- [107] Goyal, P., Pandey, D., Behring, A. and Siess, W. (2005) Inhibition of nuclear import of LIMK2 in endothelial cells by protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-283. *J. Biol. Chem.* 280 (30), 27569–27577.
- [108] Bui, H.T. and Shaw, J.M. (2013) Dynamin assembly strategies and adaptor proteins in mitochondrial fission. *Curr. Biol.* 23 (19), R891–R899.
- [109] DuBoff, B., Götz, J. and Feany, M.B. (2012) Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo. *Neuron* 75 (4), 618–632.
- [110] Korf, B.R. (2013) Neurofibromatosis. *Handb. Clin. Neurol.* 111, 333–340.

- [111] Diggs-Andrews, K.A. and Gutmann, D.H. (2013) Modeling cognitive dysfunction in neurofibromatosis-1. *Trends Neurosci.* 36 (4), 237–247.
- [112] Daston, M.M., Scrabble, H., Nordlund, M., Sturbaum, A.K., Nissen, L.M. and Ratner, N. (1992) The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 8 (3), 415–428.
- [113] Starinsky-Ehbaz, S., Faigenbloom, L., Friedman, E., Stein, R. and Kloog, Y. (2009) The pre-GAP-related domain of neurofibromin regulates cell migration through the LIM kinase/cofilin pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* 42 (4), 278–287.
- [114] Ozawa, T., Araki, N., Yunoue, S., Tokuo, H., Feng, L., Patrakitkomjorn, S., Hara, T., Ichikawa, Y., Matsumoto, K., Fujii, K. and Saya, H. (2005) 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.* 280 (47), 39524–39533.
- [115] Vallée, B., Doudeau, M., Godin, F., Gombault, A., Tchaliikian, A., de Tauzia, M.-L. and Bénédetti, H. (2012) N1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways. *PLoS ONE* 7 (10), e47283.
- [116] American Psychiatric Association and DSM-5 Task Force (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5*, American Psychiatric Publishing, Washington, D.C.
- [117] Wu, Y.Q., Sutton, V.R., Nickerson, E., Lupski, J.R., Potocki, L., Korenberg, J.R., Greenberg, F., Tassabehji, M. and Shaffer, L.G. (1998) Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am. J. Med. Genet.* 78 (1), 82–89.
- [118] Martens, M.A., Wilson, S.J. and Reutens, D.C. (2008) Research review: Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype. *J. Child Psychol. Psychiatry* 49 (6), 576–608.
- [119] Meyer-Lindenberg, A., Mervis, C.B. and Berman, K.F. (2006) Neural mechanisms in Williams syndrome: a unique window to genetic influences on cognition and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (5), 380–393.
- [120] Mervis, C.B., Robinson, B.F., Bertrand, J., Morris, C.A., Klein-Tasman, B.P. and Armstrong, S.C. (2000) The Williams syndrome cognitive profile. *Brain Cogn.* 44 (3), 604–628.
- [121] Mervis, C.B. and Velleman, S.L. (2011) Children with Williams syndrome: language, cognitive, and behavioral characteristics and their implications for intervention. *Perspect. Lang. Learn. Educ.* 18 (3), 98–107.
- [122] Faury, G., Pezet, M., Knutsen, R.H., Boyle, W.A., Heximer, S.P., McLean, S.E., Minkes, R.K., Blumer, K.J., Kovacs, A., Kelly, D.P., Li, D.Y., Starcher, B. and Mecham, R.P. (2003) Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J. Clin. Invest.* 112 (9), 1419–1428.
- [123] Hirano, E., Knutsen, R.H., Sugitani, H., Ciliberto, C.H. and Mecham, R.P. (2007) Functional rescue of elastin insufficiency in mice by the human elastin gene: implications for mouse models of human disease. *Circ. Res.* 101 (5), 523–531.
- [124] Pober, B.R. (2010) Williams–Beuren syndrome. *N. Engl. J. Med.* 362 (3), 239–252.
- [125] Schubert, C. (2009) The genomic basis of the Williams–Beuren syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (7), 1178–1197.
- [126] 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., Pröschel, C., Gutowski, N. J., Noble, M., Atkinson, D.L., Odelberg, S.J. and Keating, M.T. (1996) LIM-kinase1 hemizygoty implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 86 (1), 59–69.
- [127] Wang, J.Y., Frenzel, K.E., Wen, D. and Falls, D.L. (1998) Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J. Biol. Chem.* 273 (32), 20525–20534.
- [128] Tassabehji, M., Metcalfe, K., Karmiloff-Smith, A., Carette, M.J., Grant, J., Dennis, N., Reardon, W., Splitt, M., Read, A.P. and Donnai, D. (1999) Williams syndrome: use of chromosomal microdeletions as a tool to dissect cognitive and physical phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1), 118–125.
- [129] Karmiloff-Smith, A., Grant, J., Ewing, S., Carette, M.J., Metcalfe, K., Donnai, D., Read, A.P. and Tassabehji, M. (2003) Using case study comparisons to explore genotype–phenotype correlations in Williams–Beuren syndrome. *J. Med. Genet.* 40 (2), 136–140.
- [130] Donnai, D. and Karmiloff-Smith, A. (2000) Williams syndrome: from genotype through to the cognitive phenotype. *Am. J. Med. Genet.* 97 (2), 164–171.
- [131] Gray, V., Karmiloff-Smith, A., Funnell, E. and Tassabehji, M. (2006) In-depth analysis of spatial cognition in Williams syndrome: a critical assessment of the role of the LIMK1 gene. *Neuropsychologia* 44 (5), 679–685.
- [132] Hoogenraad, C.C., Koelkoek, B., Akhmanova, A., Krugers, H., Dortland, B., Miedema, M., van Alphen, A., Kistler, W.M., Jaegel, M., Koutsourakis, M., Van Camp, N., Verhoye, M., van der Linden, A., Kaverina, I., Grosveld, F., De Zeeuw, C.I. and Galjart, N. (2002) Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat. Genet.* 32 (1), 116–127.
- [133] Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Galjart, N. and De Zeeuw, C.I. (2004) LIMK1 and CLIP-115: linking cytoskeletal defects to Williams syndrome. *BioEssays* 26 (2), 141–150.
- [134] van Os, J. and Kapur, S. (2009) Schizophrenia. *Lancet* 374 (9690), 635–645.
- [135] Le Pen, G., Grottick, A.J., Higgins, G.A., Martin, J.R., Jenck, F. and Moreau, J.L. (2000) Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behav. Pharmacol.* 11 (3–4), 257–268.
- [136] Wong, A.H.C., Lipska, B.K., Likhodi, O., Boffa, E., Weinberger, D.R., Kennedy, J.L. and Van Tol, H.H.M. (2005) Cortical gene expression in the neonatal ventral-hippocampal lesion rat model. *Schizophr. Res.* 77 (2–3), 261–270.
- [137] Genis-Mendoza, A.D., Gallegos-Silva, R.L., López-Casamichana, M., López-Rubalcava, C. and Nicolini, H. (2013) Gene expression profiles of nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus in an animal model of schizophrenia: proposed candidate genes. *Actas Esp. Psiquiatr.* 41 (3), 154–163.
- [138] Hill, J.J., Hashimoto, T. and Lewis, D.A. (2006) Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 11 (6), 557–566.
- [139] Datta, D., Arion, D., Corradi, J.P. and Lewis, D.A. (2015) Altered expression of CDC42 signaling pathway components in cortical layer 3 pyramidal cells in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry*.
- [140] Li, X.-L., Hu, N., Tan, M.-S., Yu, J.-T. and Tan, L. (2014) Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *BioMed Res. Int.* 2014, 927804.
- [141] Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297 (5580), 353–356.
- [142] Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M. and Braak, H. (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58 (12), 1791–1800.
- [143] Heredia, L., Helguera, P., de Olmos, S., Kedikian, G., Solá Vigo, F., LaFeria, F., Staufienbiel, M., de Olmos, J., Busciglio, J., Cáceres, A. and Lorenzo, A. (2006) Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid beta-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26 (24), 6533–6542.
- [144] Maloney, M.T., Minamide, L.S., Kinley, A.W., Boyle, J.A. and Bamberg, J.R. (2005) Beta-secretase-cleaved amyloid precursor protein accumulates at actin inclusions induced in neurons by stress or amyloid beta: a feedforward mechanism for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25 (49), 11313–11321.
- [145] Maloney, M.T. and Bamberg, J.R. (2007) Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies. *Mol. Neurobiol.* 35 (1), 21–44.
- [146] Chen, X. and Macara, I.G. (2006) Par-3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly. *J. Cell Biol.* 172 (5), 671–678.
- [147] Turner, C.E. (2000) Paxillin interactions. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 23), 4139–4140.
- [148] Grace, E.A. and Busciglio, J. (2003) Aberrant activation of focal adhesion proteins mediates fibrillar amyloid beta-induced neuronal dystrophy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (2), 493–502.
- [149] Hoyer, S., Lee, S.K., Löffler, T. and Schliebs, R. (2000) Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 256–258.
- [150] Hou, Y., Zhou, L., Yang, Q.D., Du, X.P., Li, M., Yuan, M. and Zhou, Z.W. (2012) Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudil hydrochloride. *Neuroscience* 200, 120–129.
- [151] Jankovic, J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79 (4), 368–376.
- [152] Lang, A.E. and Lozano, A.M. (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339 (15), 1044–1053.
- [153] Bertoli-Avella, A.M., Giroud-Benitez, J.L., Akyol, A., Barbosa, E., Schaap, O., van der Linde, H.C., Martignoni, E., Lopiano, L., Lamberti, P., Fincati, E., Antonini, A., Stocchi, F., Montagna, P., Squitieri, F., Marini, P., Abbruzzese, G., Fabbrini, G., Marconi, R., Dalla Libera, A., Trianni, G., Guidi, M., De Gaetano, A., Boff Maegawa, G., De Leo, A., Gallai, V., de Rosa, G., Vanacore, N., Mecco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., Heutink, P., Bonifati, V. and Italian Parkinson Genetics Network (2005) Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 20 (4), 424–431.
- [154] Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Nature* 392 (6676), 605–608.
- [155] Lücking, C.B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Mecco, G., Denefle, P., Wood, N.W., Agid, Y., Brice, A., French Parkinson's Disease Genetics Study Group and European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.* 342 (21), 1560–1567.
- [156] Glasson, B.I. and Lee, V.M. (2001) Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron* 31 (6), 885–888.
- [157] Imai, Y., Soda, M. and Takahashi, R. (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin–protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275 (46), 35661–35664.
- [158] Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S.I., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. and Suzuki, T. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin–protein ligase. *Nat. Genet.* 25 (3), 302–305.
- [159] Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin–protein ligase and

- promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (24), 13354–13359.
- [160] Lim, M.K., Kawamura, T., Ohsawa, Y., Ohtsubo, M., Asakawa, S., Takayanagi, A. and Shimizu, N. (2007) Parkin interacts with LIM Kinase 1 and reduces its cofilin-phosphorylation activity via ubiquitination. *Exp. Cell Res.* 313 (13), 2858–2874.
- [161] Huynh, D.P., Scoles, D.R., Ho, T.H., DeI Bigio, M.R. and Pulst, S.M. (2000) Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Ann. Neurol.* 48 (5), 737–744.
- [162] Kubo, S.I., Kitami, T., Noda, S., Shimura, H., Uchiyama, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Mizuno, Y. and Hattori, N. (2001) Parkin is associated with cellular vesicles. *J. Neurochem.* 78 (1), 42–54.
- [163] Ren, Y., Zhao, J. and Feng, J. (2003) Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (8), 3316–3324.
- [164] Acevedo, K., Moussi, N., Li, R., Soo, P. and Bernard, O. (2006) LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 54 (5), 487–501.
- [165] Foletta, V.C., Moussi, N., Sarmiere, P.D., Bamberg, J.R. and Bernard, O. (2004) LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp. Cell Res.* 294 (2), 392–405.
- [166] Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A. and Nakamura, T. (2001) Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J. Biol. Chem.* 276 (25), 23092–23096.
- [167] Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. and Nakamura, T. (1999) Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147 (7), 1519–1532.
- [168] Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. and Minden, A. (2001) Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J. Biol. Chem.* 276 (34), 32115–32121.
- [169] Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. and Gill, G.N. (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1 (5), 253–259.
- [170] Misra, U.K., Deedwania, R. and Pizzo, S.V. (2005) Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J. Biol. Chem.* 280 (28), 26278–26286.
- [171] Wu, H., Zheng, Y. and Wang, Z.-X. (2003) Evaluation of the catalytic mechanism of the p21-activated protein kinase PAK2. *Biochemistry (Mosc.)* 42 (4), 1129–1139.
- [172] Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S. and Mizuno, K. (2001) LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J.* 354 (Pt 1), 149–159.
- [173] Sumi, T., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2001) Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276 (1), 670–676.
- [174] Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Mizuno, K. (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275 (5), 3577–3582.
- [175] Yang, X., Yu, K., Hao, Y., Li, D., Stewart, R., Insogna, K.L. and Xu, T. (2004) LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nat. Cell Biol.* 6 (7), 609–617.

Objectifs

La neurofibromatose de type 1 est caractérisée par un tableau clinique complexe, dont les symptômes les plus invalidants sont l'apparition de tumeurs, pouvant dégénérer en cancers, et les troubles cognitifs. Le gène à l'origine de la pathologie code la neurofibromine (NF1), notamment impliquée dans la régulation de la voie Ras. Plusieurs études ont montré que cette protéine régulait également la voie des LIMK. Plus particulièrement, l'équipe du Dr. Bénédicti a montré que le domaine SecPH de NF1 interagissait avec la protéine LIMK2, inhibant sa phosphorylation par ROCK (Vallée et al., 2012).

La famille des LIMK inclut deux membres : LIMK1 et LIMK2. Ce sont des sérines/thréonines kinases connues pour leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine, via la phosphorylation et l'inactivation de la cofiline (Arber et al., 1998a; Maekawa et al., 1999; Sumi et al., 1999; Yang et al., 1998b), et dans l'organisation des microtubules (Gorovoy et al., 2005; Li et al., 2016; Po'uha et al., 2010). Elles pourraient être impliquées à la fois dans les aspects tumoraux et cognitifs de la neurofibromatose de type 1 par leur rôle dans la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules.

Chez l'homme, il existe trois isoformes de LIMK2 : LIMK2-2a, LIMK2-2b et LIMK2-1. Si les deux premières sont bien caractérisées, il n'existe en revanche que très peu de données sur la troisième, LIMK2-1. Au cours d'une thèse précédente, il a été montré que LIMK2-1 est une isoforme spécifique des primates. De plus, une variation rare de cette protéine a été identifiée, dans le domaine PP1i, chez des patients atteints de déficience intellectuelle (Tastet, 2012).

L'objectif de ce travail a été de caractériser cette isoforme afin, d'une part, d'évaluer son implication potentielle dans la déficience intellectuelle et, d'autre part, de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la voie des LIMK et dans la neurofibromatose de type 1.

Dans un premier temps, nous avons réexaminé les séquences actuelles de LIMK2 dans les bases de données et montré que LIMK2-1 n'existait que chez les hominidés. Nous avons ensuite analysé son expression. Nous avons recherché l'existence d'une protéine LIMK2-1 dans des lignées humaines et dans des tissus humains, puis nous avons étudié l'expression de LIMK2-1 dans le système nerveux central au niveau transcrit et protéique.

Objectifs

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux fonctions moléculaires de LIMK2-1. Cette isoforme possède un domaine kinase tronqué de quelques acides aminés et un domaine inhibiteur de la phosphatase 1 (PP1i) en C-terminal. Nous avons étudié le rôle de cette isoforme sur la polymérisation de l'actine, son activité kinase et l'impact de son domaine PP1i sur la phosphatase 1 (PP1), un facteur de déphosphorylation de la cofiline.

Enfin, nous avons étudié l'impact de la variation identifiée précédemment sur les fonctions moléculaires caractérisées. Puis nous avons recherché et commencé la mise au point d'un modèle cellulaire adapté à l'étude de l'impact de LIMK2-1 et de la variation de LIMK2-1 sur le neurodéveloppement.

Matériels et méthodes

I. Etude d’expression

I.1. Validation de l’anticorps anti-PP1i

I.1.1. Culture cellulaire

Afin de valider l’anticorps anti-PP1i, deux lignées cellulaires ont été utilisées : les cellules HEK-293 (CRL1573™, ATCC®), qui sont des cellules embryonnaires de rein humaines, et les cellules NSC-34 (Tebu-bio), obtenues par fusion de motoneurones et de cellules issues de neuroblastomes murins (Cashman et al., 1992). Les cellules HEK-293 et NSC-34 ont été cultivées en présence de DMEM 1 g/L glucose et 4,5 g/L glucose (Sigma-Aldrich), respectivement, supplémenté avec 10 % de SVF inactivé dans un incubateur à 37°C ayant une atmosphère à 5 % de CO₂ saturée en humidité.

I.1.2. Transfection au phosphate de calcium

Les HEK ont été transfectées avec soit 10 µg de plasmides HA-LIMK2-2b, soit 20 µg de plasmides HA-LIMK2-1 (Vallée et al., 2012). Avant chaque transfection, les boîtes (100 mm) ont été traitées pendant 2 heures avec 5 ml de collagène R 0,2 % (Pan™ biotech) dilué au 1/200^e, puis rincées deux fois au PBS. Les HEK ont ensuite étéensemencées 24h avant la transfection. Lors de la transfection, les plasmides ont été dilués dans un mélange de 450 µl de TE (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) stérile et de 50 µl de CaCl₂, puis 500 µl de BES (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés goutte-à-goutte au mélange sous faible agitation. La solution a été laissée 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont été rincées au PBS 1X puis le milieu a été remplacé par du milieu neuf. La solution a ensuite été ajoutée goutte-à-goutte aux cellules qui ont été replacées dans l’incubateur. Le milieu a été changé le lendemain matin.

I.1.3. Lyse des cellules et dosage des protéines

Les cellules ont été lysées deux jours après la transfection. Elles ont été rincées 2 fois avec du PBS 1X, puis lysées avec 500 µl de tampon de lyse (50 mM Tris/HCl à pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 50 mM NaF, 10 mM pyrophosphate de sodium, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mg/ml aprotinine, 0,05 mg/ml acide ocaïdique, 1 mg/ml leupeptine et 1 mM PMSF). Les cellules ont été incubées

sur la glace pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré après centrifugation du lysat cellulaire pendant 10 minutes à 10000 g à 4°C. Les protéines ont ensuite été dosées au BCA grâce au kit BC Assay Protein Quantification Small Kit (Uptima) en suivant les instructions du fabricant.

I.1.4. Western blot

Les protéines ont été séparées en fonction de leur masse moléculaire par migration dans un gel contenant 10 % d'acrylamide/bis-acrylamide 40 %. Trente µg de protéines totales préalablement dénaturées ont été déposées sur ce gel et la migration des protéines a été effectuée à 200 V pendant environ 1 heure. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane polyvinylidène difluoride (PVDF) grâce à un courant électrique de 100 V pendant 1 heure.

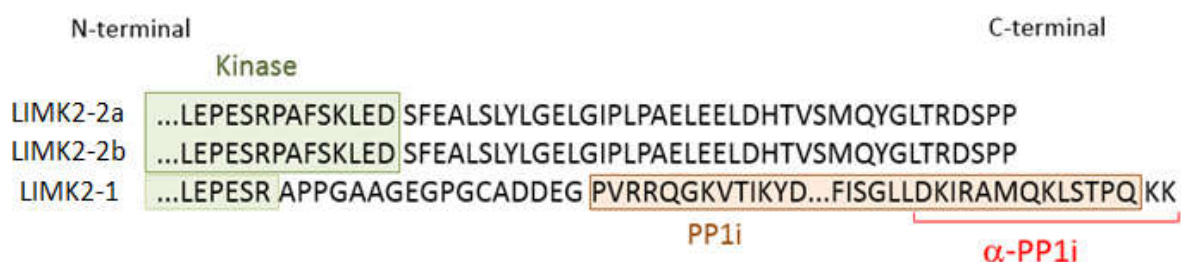


Figure 29 : Anticorps de lapin anti-PP1i

L'anticorps est dirigé contre le peptide DKIRAMQKLSTPQKK. L'extrémité C-terminale de chacune des isoforme est représentée. Seuls le début et la fin du domaine PP1i de LIMK2-1 apparaissent.

Les sites non-spécifiques de la membrane de PVDF ont été saturés pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de tampon TBS 1X contenant 0,1 % de Tween 20 (TBST 1X) et 5 % de lait écrémé. Les membranes ont ensuite été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBST avec 5 % de lait écrémé. Les anticorps utilisés sont un anticorps de lapin anti-PP1i (Figure 29) développé par Eurogentec et dilué au 1/3000, un anticorps polyclonal de lapin anti-actine (A2060, 1/3000, Sigma-Aldrich) et un anticorps monoclonal de rat anti-HA (3F10, 1/5000, Roche Applied Science). Après 6 rinçages de 5 minutes, les membranes ont été incubées avec une solution de TBST contenant 5 % de lait écrémé et un anticorps secondaire anti-lapin (65-6120, Invitrogen™) ou anti-rat (62-9520, Invitrogen™), chacun couplé à la peroxydase et dilué au 1/33000 pendant 2 heures à

température ambiante sous agitation. La présence des protéines reconnues par les anticorps a ensuite été révélée par incubation des membranes pendant 4 minutes dans la solution du kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFischer Scientific). La membrane a été révélée à l’aide du Pxi6 Syngene (GENESys).

I.2. Expression de LIMK2-1 dans le système nerveux central

I.2.1. Echantillons

Les ADNc et les protéines totales de cerveau fœtal, de cortex, d’hippocampe et de cervelet adultes humains ont été commandés sur le site Clinisciences et fournis par BioChain® (Newark, CA). Ils ont été extraits suivant des procédures standards approuvées d’un point de vue éthique par l’Institutional Review Board.

I.2.2. Expression des ADNc

I.2.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le choix des couples d’amorces utilisés pour l’amplification d’une région spécifique du gène *LIMK2-1* a été effectué grâce au logiciel Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Le gène de ménage *GAPDH* a été utilisé comme étalon interne. Le mélange réactionnel de la PCR se compose de 25 µl contenant 1 µl d’ADNc, en accord avec les instructions du fournisseur, 5 µl de tampon 5X, 1,5 µl de MgCl₂, 1,25 µl de dNTP (Invitrogen™), 1,25 µl de chaque amorce (Tableau 2) et 0,2 µl de Taq (GoTaq DNA Polymerase, Promega). L’amplification a été réalisée dans un thermocycler Biorad iCycler pendant 35 cycles comprenant 10 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d’hybridation des amorces sur l’ADN cible à 60°C et 30 secondes d’élongation à 72°C. Ces 35 cycles ont été précédés d’une dénaturation initiale de 7 minutes à 95°C et suivis d’une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour l’étude d’expression de *LIMK2-1*

Gène		Séquence des amorces (5’-3’)	Longueur du fragment
<i>LIMK2-1</i>	Sens F	CATCTGCTGCAGACTGGAGC	149 pb
	Sens R	GGTTGAGGTGCTTCCGTAGC	
<i>GAPDH</i>	Sens F	CTGCACCACCAACTGCTTAG	108 pb
	Sens R	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	

La vérification du produit de PCR a été effectuée par migration des produits de PCR sur gel d'agarose (Eurobio®) à 1,8 % dans du tampon TBE 1X (Tris 1,0 M, acide borique 1,9 M, EDTA 0,01M). Le bromure d'éthidium (BET, Merk®) incorporé à 0,5 µg/µl dans le gel permet de visualiser les fragments obtenus en s'intercalant dans l'ADN et en émettant une fluorescence après une irradiation aux UV (312 nm). La taille des fragments amplifiés a été estimée par comparaison avec un marqueur de taille ayant migré en parallèle.

I.2.2.2. Séquençage

Le séquençage nous a permis de vérifier que le fragment amplifié correspondait bien à la région attendue de *LIMK2-1*. Les deux brins du produit de PCR ont été séquencés séparément. Cette réaction a été effectuée dans un volume de 10 µl contenant les produits de PCR, 2 µl d'amorces, 1,5 µl de tampon BigDye Terminator v1.1, v3.1 (Applied Biosystem®) et 1 µl de mix BigDye Terminator v1.1 cycle (Applied Biosystem®). La réaction de séquençage s'est déroulée suivant le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivie de 35 cycles d'1 minute à 95°C, 30 secondes à 60°C et 1 minute à 72°C, puis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Après purification des produits du cycle de séquençage à l'aide du kit de purification Montage Millipore, les séquences d'ADN ont été lues par électrophorèse capillaire sur un séquenceur ABI 3130xl 16 capillaires (Applied®) situé sur le site de l'UTTIL de l'hôpital Bretonneau. Les séquences ont ensuite été analysées avec le logiciel CodonCode Aligner.

I.2.3. Expression des protéines

I.2.3.1. Western blot

Les protéines de cerveau fœtal, de cortex, hippocampe et cervelet adultes humains ont été analysées par Western blot suivant le protocole décrit en I.I.4.

II. Etude moléculaire

II.1. Productions des plasmides

Afin d'étudier le rôle de LIMK2-1 au niveau moléculaire, plusieurs plasmides ont été produits au cours de cette thèse. D'autres avaient déjà été produits au laboratoire. Tous ces plasmides sont décrits dans le Tableau 3 et la Figure 30.

Tableau 3 : Détail des plasmides utilisés

Plasmide	Description	Source/référence
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-1	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LIMK2-1	Equipe H. Bénédetti
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-1S668P	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LIMK2-1S668P	Equipe H. Bénédetti
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-1T596D	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LIMK2-1T596D	Cette thèse
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-1ΔPP1i	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LIMK2-1ΔPP1i	Cette thèse
pcDNA3-(HA) ₂ -KIN1-LIMK2-1	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -KIN1	Equipe H. Bénédetti
pcDNA3-(HA) ₂ -PP1i-LIMK2-1	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -PP1i-LIMK2-1	Cette thèse
pcDNA3-(HA) ₂ -PP1i-LIMK2-1S668P	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -PP1i-LIMK2-1S668P	Cette thèse
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-2a	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LIMK2-2a	Vallée et al., 2012
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-2aΔCter	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LIMK2-2aΔCter	Cette thèse
pcDNA3-(HA) ₂ -KIN2-LIMK2	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -KIN2-LIMK2-2a	Vallée et al., 2012
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-2b	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LIMK2-2b	Vallée et al., 2012
p3XFlag-PP1	<i>P_{CMV}</i> -PP1	Cette thèse
pET45-6His-Cofiline	<i>P_{CMV}</i> -Cofiline	Cette thèse
pEN-6His-Cofiline	<i>P_{CMV}</i> -Cofiline	Cette thèse
pcDNA3-(HA) ₂ -LARP6	<i>P_{CMV}</i> -(HA) ₂ -LARP6	Equipe H. Bénédetti
p3XFlag-Gal3	<i>P_{CMV}</i> -Gal3	Equipe A. Legrand

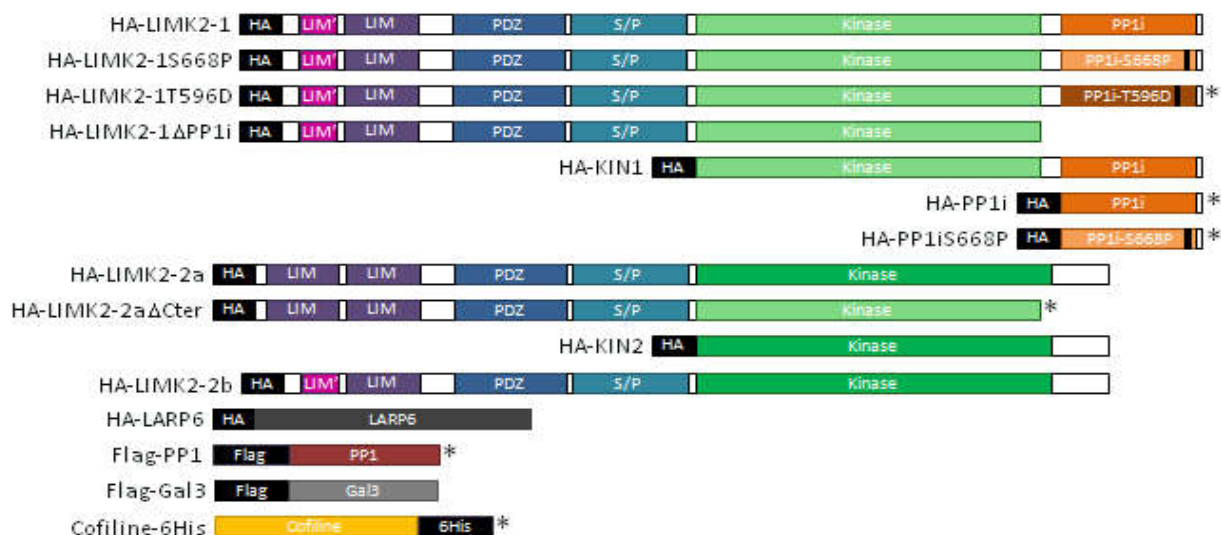


Figure 30 : Schéma des constructions utilisées
Les constructions produites au cours de cette thèse sont marquées d'une étoile (*).

II.1.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le détail des couples d'amorces utilisés est donné dans le Tableau 4. Le mélange réactionnel de la PCR se compose de 50 µl contenant 1 µl d'ADN, 36,5 µl d'eau pour préparation injectable (PPI), 2,5 µl de Diméthylsulfoxyde (DMSO), 5 µl de tampon 10X High fidelity (Platinum®, Invitrogen™), 2 µl de MgSO₄ 50 mM (Platinum®, Invitrogen™), 1 µl de dNTP à 10 µM (Invitrogen™), 1 µl de chaque amorce diluées à 10 µM et 0,2 µl de Taq polymérase (Platinum®, Invitrogen™). L'amplification est réalisée dans un thermocycler Bioer Technology pendant 30 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation à 59°C et 1 à 2 minutes d'élongation à 68°C en fonction de la longueur du fragment à amplifier. Ces 30 cycles ont été précédés d'une dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C et suivis d'une élongation finale de 7 minutes à 68°C.

La vérification du produit de PCR a été effectuée par migration des produits de PCR sur gel d'agarose (Eurobio) à 1,2 % dans du tampon TAE 1X (Euromedex). Le BET (Nalgene®) incorporé à 0,5 µg/µl dans le gel permet de visualiser les fragments obtenus en s'intercalant dans l'ADN et en émettant une fluorescence après une irradiation aux UV (312 nm). La taille des fragments amplifiés a été estimée par comparaison avec un marqueur de taille ayant migré en parallèle. Les fragments de PCR ont ensuite été purifiés sur gel à l'aide du kit Gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel).

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour les clonages

Construction		Séquence des amorces (5'-3')	Longueur du fragment
HA-LIMK2-2aΔCter	Sens F	CTGAGCGAATTCTCCGCGCTGGCGGGTGAAGATGTC	1767 pb
	Sens R	CGCGCGTCTAGACTAGCTCTCAGGCTCTCTGCAGCA	
HA-LIMK2-1ΔPP1i	Sens F	CGCGCGGAATTCGGGAGTTACCTTGTCAGTCCGGGCT	1704 pb
	Sens R	CGCGCGTCTAGACTAAGCCCAGGCATCGTCACTCTCCATGTC	
HA-PP1i	Sens F	CGACGTAAGCTTTCCGACAGCGAGAAGCTCAAC	319 pb
	Sens R	CGCGCGTCTAGACTACTTCTTCTGGGGTGTGCTCAGCTT	
PP1-Flag	Sens F	CGACGTAAGCTTTCCGACAGCGAGAAGCTCAAC	1028 pb
	Sens R	CGACGTGAATTCCTATTTCTTGGCTTTGGCGGAATTGCC	
Cofiline-6His (pET45)	Sens F	CGCGTGCCATGGCCTCCGGTGTGGCTGTCT	519 pb
	Sens R	CGCGTGCTCGAGTCAGTGATGGTGGTGGTGAAGCTTCA AAGGCTTGCCCTCCAGGGA	
Cofiline-6His (pEN)	Sens F	CGCGTGCTAGCTGCCACCATGGCCTCCGGTGTGGCTGTCT	519 pb
	Sens R	CGCGTGAAGCTTTCAGTGATGGTGGTGGTGAAGCGCCGCT CAAAGGCTTGCCCTCCAGGGA	

II.1.2. Mutagenèse dirigée

La construction du plasmide HA-LIMK2-1T596D a nécessité une étape de mutagenèse dirigée (Figure 31) qui a permis d'insérer la mutation Thr596Asp. Deux segments d'ADN, l'un s'étendant "en amont" et l'autre "en aval" de la mutation désirée ont été amplifiés en utilisant des amorces qui introduisent la mutation désirée et génèrent des produits de PCR qui se chevauchent sur 20 nucléotides ou plus dans la région d'incorporation de la mutation. Quand ces deux produits de PCR sont mélangés, dénaturés et hybridés l'un avec l'autre, un des produits possibles est composé de deux brins d'ADN qui s'hybrident sur une courte région au niveau de leur extrémité 3'. Cette molécule peut être polymérisée par l'ADN polymérase pour générer une matrice correspondant au fragment entier portant la mutation. Cette matrice est ensuite amplifiée par une troisième PCR utilisant les amorces 1 et 3. Les amorces utilisées pour la construction de HA-LIMK2-1T596D sont détaillés dans le Tableau 5. Les protocoles utilisés pour les deux PCR sont décrits en II.1.1.

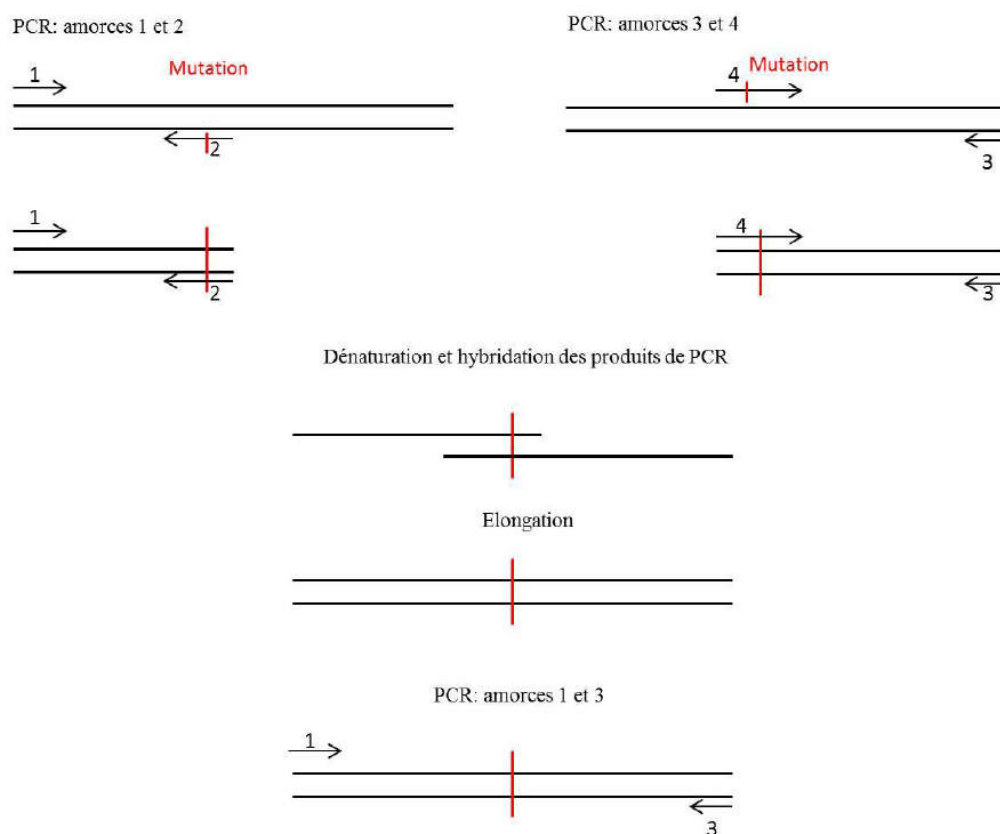


Figure 31 : Technique de mutagenèse dirigée

Tableau 5 : Séquences utilisées pour la construction de HA-LIMK2-1T596D

Construction		Séquence des amorces (5'-3')	Longueur du fragment
HA-LIMK2-1T596D	Sens F	CGCGCGGAATTCGGGAGTTACTTGTTCAGTCCCGGCT	294 pb
Amplicon A	Sens R	CTCCTTGGGGTCATACTTGATGTCGACCTTCCCTTGGGGCCTCAC	
HA-LIMK2-1T596D	Sens F	GTGAGGCGCCAAGGGAAGGTCGACATCAAGTATGACCCCAAGGAG	1808 pb
Amplicon B	Sens R	CGCGCGTCTAGACTACTTCTTCTGGGGTGTGCTCAGCTT	

II.1.3. Clonage

Afin de cloner les différentes constructions, 30 µl de produits de PCR et 15 µl de plasmides ont été digérés sur la nuit à 37°C par les enzymes de restrictions (Biolabs®) détaillées dans le Tableau 6. Les produits de PCR ont été digérés en présence de 8,4 µl d'eau PPI, de 5 µl du tampon adapté (Biolabs®), de 5 µl de BSA (Biolabs®) et de 0,8 µl de chaque enzyme de restriction. Les plasmides ont été digérés en présence de 16 µl d'eau PPI, de 4 µl du tampon adapté, de 5 µl de BSA et de 0,5 µl de chaque enzyme de restriction.

Tableau 6 : Conditions de digestion des produits de PCR et des plasmides

Plasmide	Construction	Enzymes utilisées	Taille de la construction
pcDNA3	HA-LIMK2-2aΔCter	EcoRI, XbaI	1767 pb
	HA-LIMK2-1ΔPP1i		1704 pb
	HA-LIMK2-1T596D		2102 pb
	HA-PP1i		319 pb
	HA-PP1iS668P		319 pb
p3X-Flag	PP1	EcoRI, HindIII	1028 pb
pET45	CofilineA	NcoI, XhoI	519 pb
pEN	CofilineB	NheI, HindIII	519 pb

Les fragments de PCR et les plasmides digérés ont été analysés par migration sur gel d'agarose 1,2 %. Les fragments ont ensuite été purifiés sur gel à l'aide du kit Gel and PCR Clean Up® (Macherey-Nagel).

Les constructions ont été insérées dans leurs vecteurs respectifs par ligation. Afin de calculer la quantité d'inserts nécessaire, la formule suivante a été utilisée :

$$m_{\text{insert}} = 10 \times m_{\text{vecteur}} \times (t_{\text{insert}} / t_{\text{vecteur}})$$

« m » correspond à la masse du vecteur en ng et « t » à sa taille en pb. Les calculs ont été effectués pour 50 ng de vecteur. Pour effectuer la ligation, le vecteur et l'insert ont été ajoutés à 2 µl de tampon 5X, 5 µl de tampon 2X et 0,5 µl de ligase (Rapid DNA Ligation kit, Roche

Applied Science) puis laissés 10 minutes dans la glace et stockés à -20°C en attendant la transformation.

En parallèle, afin de les rendre compétentes, 100 µl d'*E. coli* C600 ont été ensemencées dans 3 ml de milieu Luria Broth (LB, Difco™) à 37°C sous agitation sur la nuit. Le lendemain, 300 µl de cette préculture ont été ensemencés dans 10 ml de milieu LB et placées à 37°C sous agitation pendant environ 1h30, jusqu'à ce que la DO soit comprise entre 0,7 et 0,9 à 600 nm. Les cellules ont ensuite été centrifugées 10 minutes à 4°C à 4000 rpm. Le surnageant a été retiré puis remplacé par 500 µl de TSB (10 % PEG, 5 % DMSO, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, qsp 10 ml LB). Les C600 ont été resuspendues et stockées à 4°C jusqu'à la transformation.

Pour effectuer la transformation, 5 µl de produit de ligation ont été ajoutés à 50 µl de C600 compétentes et laissés à 4°C pendant 30 minutes, puis 250 µl de TSB et 8 µl de glucose 50 % ont été ajoutés à la solution qui a été incubée 1h à 37°C sous agitation. Les C600 ont ensuite été étalées sur milieu LB-Agar, contenant 100 µl/ml d'ampicilline pour les plasmides pCDNA3, p3X-Flag et pET45, et 100 µl/ml de kanamycine pour pEN, puis incubées à 37°C sur la nuit. Les plasmides ont ensuite été extraits et purifiés grâce au kit Nucleospin Plasmid® (Macherey-Nagel). La concentration et la pureté des plasmides ont été déterminées par mesure de la densité optique de la solution de plasmide à 260 et 280 nm.

II.1.4. Séquençage

Afin de vérifier la séquence de l'insert, les plasmides ont été envoyés à séquencer chez Eurofins Genomics, puis les plasmides ont été produits en plus grande quantité grâce au kit NucleoBond Xtra Midi® (Macherey-Nagel).

II.2. Etude de la polymérisation de l'actine

II.2.1. Culture cellulaire

Les cellules HeLa (CCL-2, ATCC®) proviennent d'un prélèvement de métastase issu d'un cancer du col de l'utérus (Skloot, 2010) et ont été cultivées en présence de DMEM Glutamax 4,5 g/L glucose (Invitrogen™) supplémenté avec 10 % de SVF inactivé, 100U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine dans un incubateur à 37°C ayant une atmosphère à 5 % de CO₂ saturée en humidité.

II.2.2. Transfection à la lipofectamine

Avant chaque transfection, les lamelles de verre d'un diamètre de 13 mm ont été traitées pendant 2 heures avec 5 ml de collagène R 0,2 % (Pan™ biotech) dilué au 1/200^e, puis rincées deux fois au PBS 1X. Les cellules HeLa ont ensuite étéensemencées sans antibiotiques 24h avant la transfection. Lors de la transfection, 2 µg de plasmides HA-LARP6, HA-LIMK2-2a, HA-LIMK2-2aΔCter, HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1, HA-LIMK2-1ΔPP1i ou HA-LIMK2-1S668P ont été dilués dans 150 µl de DMEM Glutamax 4,5 g/L glucose (Invitrogen™) tandis que 4 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen™) étaient dilués dans 96 µl de DMEM Glutamax 4,5 g/L glucose (Invitrogen™). LARP6 est une protéine impliquée dans la traduction des ARNm du collagène et nous sert de témoin négatif. Les solutions ont été laissées à température ambiante 5 minutes. L'ADN a ensuite été ajouté à la lipofectamine goutte-à-goutte puis les solutions ont été laissées à température ambiante 20 minutes avant d'être ajoutées aux cellules goutte-à-goutte. Après 4 heures dans l'incubateur, le milieu des cellules a été remplacé entièrement par du DMEM Glutamax 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10 % de SVF.

II.2.3. Immunocytochimie

Les cellules transfectées ont été rincées avec du PBS 1X puis perméabilisées et fixées par 500 µl de paraformaldéhyde 4 % pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois avec du PBS 1X puis incubées avec 200 µl d'une solution de blocage des sites non-spécifiques et de perméabilisation contenant 0,2 % de Triton-X100 et 2 % de BSA pendant une heure à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps anti-HA (3F10, Roche Applied Science) dilué au 1/200 dans la solution de blocage. Elles ont été lavées 3 fois 10 minutes avec du PBS 1X sous agitation puis incubées 1h avec l'anticorps secondaire anti-rat couplé à l'AlexaFluor594 (A-11007, Invitrogen™) dilué au 1/300 et 5 µl par lamelle de phalloïdine couplée à l'AlexaFluor488 (A-12379, Invitrogen™). Les lamelles ont ensuite été montées sur une lame en présence de 8 µl de Prolong® Gold anti-fade avec DAPI (Invitrogen™). L'observation des lames a été effectuée au microscope confocal Olympus FV500.

II.3. Etude de la phosphorylation de la cofiline

Afin d'étudier le rôle de LIMK2-1 dans la phosphorylation de la cofiline, les constructions HA-LIMK2-2a, HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1, HA-LIMK2-2a Δ Cter, HA-LIMK2-1 Δ PP1i et HA-LARP6 (II.1.) ont été transfectées dans des cellules HEK comme décrit en I.1.2. Le détail des quantités de plasmides transfectés est présenté dans le Tableau 7. Les protéines ont été lysées et dosées suivant le protocole décrit en I.1.3.

Tableau 7 : Plasmides transfectés pour étudier la phosphorylation de la cofiline
La quantité est fonction du taux de transfection du plasmide.

Plasmide	Quantité
HA-LIMK2-2a	5 ng
HA-LIMK2-2b	10 ng
HA-LIMK2-1	20 ng
HA-LIMK2-2a Δ Cter	10 ng
HA-LIMK2-1 Δ PP1i	20 ng
HA-LARP6	1 ng

II.3.1. Mesure de l'activité kinase *in vitro*

Pour chaque échantillon, 40 μ l de billes HA (Red Anti-HA Affinity Gel EZview™, Sigma-Aldrich) ont été rincées deux fois avec 500 μ l de TENET (80 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl et 0,1 % Triton X-100). La seconde fois, le TENET a été laissé et les billes ont été incubées sur la roue à 4°C pendant 1 heure.

Les billes ont ensuite été lavées deux fois avec du tampon de lyse pour les équilibrer, puis les lysats ont été ajoutés aux billes qui ont été incubées 2 heures à 4°C sur roue avant d'être lavées deux fois avec le tampon de lyse puis trois fois avec le tampon de phosphorylation (50 mM HEPES/NaOH à pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mg/ml leupeptine et 1 mM PMSF). Le tampon de phosphorylation a été retiré à la seringue Hamilton et les billes ont été resuspendues dans 40 μ l de tampon de phosphorylation. Pour chaque échantillon, 10 μ l de tampon de phosphorylation et 0,5 μ l de cofiline ont été ajoutés à 10 μ l de billes. Un mix composé de 10,9 μ l de tampon de phosphorylation, 1,1 μ l d'ATP 10 mM (Invitrogen™) et 5 μ Ci de γ ³²P-ATP (3000 Ci/mmol) a été préparé puis 2 μ l de ce mix ont été ajoutés aux échantillons qui ont ensuite été incubés 20 minutes à 30°C. Afin de terminer la réaction, 6 μ l de SB5x ont été ajoutés aux échantillons qui ont ensuite été chauffés 5 minutes à 95°C et centrifugés 10

minutes à 11000 g, puis chargés sur gel 15 % d'acrylamide/bis-acrylamide 40 %. La migration des protéines a été effectuée à 200 V pendant environ 45 minutes. Les gels ont ensuite été lavés 3 fois à l'eau distillée puis colorés sur la nuit avec 50 ml de BluePage fermentas (Page Blue™ Protein Staining Solution, Thermo Scientific). Le lendemain, les gels ont été lavés puis exposés pour autoradiographie. Le taux de cofiline phosphorylée (P-cofiline) marquée par rapport au taux de cofiline totale a été quantifié par le logiciel ImageJ.

II.3.2. Western blot

Les lysats cellulaires obtenus pour la mesure de l'activité kinase *in vitro* ont été analysés par Western blot en suivant les étapes décrites en I.1.4. Les protéines ont été séparées par migration dans un gel contenant 10 % ou 15 % d'acrylamide/bis-acrylamide 40 %. Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps monoclonal de rat anti-HA (3F10, 1/5000, Roche Applied Science), l'anticorps polyclonal de lapin anti-actine (A2060, 1/3000, Sigma-Aldrich), un anticorps monoclonal de lapin anti-cofiline (D3F9, 1/3000, Cell Signaling Technology®) et un anticorps monoclonal de lapin anti-phospho-cofiline qui reconnaît la sérine 3 phosphorylée de la cofiline (77G2, 1/3000, Cell Signaling Technology®). Les anticorps secondaires utilisés sont l'anticorps secondaire anti-lapin (65-6120, Invitrogen™) ou l'anticorps anti-rat (62-9520, Invitrogen™) couplés à la peroxydase et dilués au 1/33000. Le taux de P-cofiline par rapport au taux de cofiline totale a été quantifié par le logiciel ImageJ.

II.4. Etude d'interaction entre la phosphatase 1 et LIMK2-1

Afin d'étudier l'interaction entre la phosphatase 1 et LIMK2-1, la construction Flag-PP1 a été co-transfectée avec chacune des trois isoformes de LIMK2, le domaine kinase et C-terminal de LIMK2-2a, le domaine kinase et C-terminal de LIMK2-1 et LARP6 taggués HA (Figure 30). Les plasmides ont été transfectés dans des cellules HEK comme décrit en I.1.1. et I.1.2. Le détail des quantités de plasmides transfectés est présenté dans le Tableau 7 et le Tableau 8. Les protéines ont été lysées et dosées suivant le protocole décrit en I.1.3. Un aliquot de 60 µl de lysat et 20 µl de SB4x, correspondant aux protéines totales, a été stocké à -80°C.

Tableau 8 : Plasmides transfectés pour étudier l'interaction entre PP1 et LIMK2-1
La quantité est fonction du taux de transfection du plasmide.

Plasmide	Quantité
HA-LARP6	1 ng
HA-LIMK2-2a	5 ng
HA-LIMK2-2b	10 ng
HA-LIMK2-1	20 ng
HA-LIMK2-1S668P	20 ng
HA-KIN1	10 ng
HA-KIN2	10 ng
HA-PP1i	10 ng
HA-PP1iS668P	10ng
Flag-PP1	5 ng

II.4.1. Co-immunoprécipitation

Pour chaque échantillon, 60 μ l de billes Flag (Anti-Flag® M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich) ont été rincées deux fois avec 500 μ l de TENET. La seconde fois, le TENET a été laissé et les billes ont été incubées sur la roue à 4°C pendant 1 heure. Les billes ont ensuite été lavées deux fois avec du tampon de lyse puis les lysats ont été ajoutés aux billes qui ont été incubées 2 heures à 4°C sur roue avant d'être lavées cinq fois avec le tampon de lyse. Après le dernier lavage, le tampon de lyse a été retiré à la seringue Hamilton. Afin d'éluer les protéines interagissant avec les billes Flag, le peptide Flag à 20 mg/ml (Flag® peptide, Sigma-Aldrich) a été dilué au 1/10 dans du tampon de lyse et 40 μ l ont été ajoutés à chaque échantillon qui ont été incubés 30 minutes dans la glace, puis centrifugés 5 minutes à 11000 g. Le surnageant a été récupéré à la seringue Hamilton, 12 μ l de SB4x ont été ajoutés aux échantillons qui ont ensuite été stockés à -80°C.

II.4.2. Western blot

Les protéines totales et les protéines éluées ont été analysées par Western blot en suivant les étapes décrites en I.1.4. Les protéines ont été séparées par migration dans un gel contenant 10 % ou 15 % d'acrylamide/bis-acrylamide 40 %, en fonction de leur masse moléculaire. Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps monoclonal de rat anti-HA (3F10, 1/5000, Roche Applied Science) et un anticorps monoclonal de souris anti-Flag (Monoclonal Anti-Flag®, 1/5000, Sigma-Aldrich). Les anticorps secondaires utilisés sont un anticorps secondaire anti-souris (61-6520, Invitrogen™) ou anti-rat (62-9520, Invitrogen™) couplés à la peroxydase et dilués au 1/33000.

II.5. Etude de l'activité du domaine inhibiteur de la phosphatase 1

II.5.1. Purification de la cofiline phosphorylée

Afin d'étudier l'activité du domaine inhibiteur de la phosphatase 1, nous avons dans un premier purifié la cofiline phosphorylée. Pour cela, nous avons transfecté 10 µg de cofiline-6his clonée dans pEN dans des cellules HEK suivant le protocole décrit en et I.1.2.

II.5.1.1. Lyse des cellules et dosage des protéines

Les cellules ont été lysées deux jours après la transfection. Elles ont été rincées 2 fois avec du PBS 1X, puis lysées avec 500 µl de tampon de lyse à pH 8 (50 mM Tris/HCl à pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 50 mM NaF, 10 mM pyrophosphate de sodium, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mg/ml aprotinine, 0,05 mg/ml acide ocaïdique, 1 mg/ml leupeptine, 5 mM d'imidazole pH 8 et 1 mM PMSF). Les cellules ont été incubées sur la glace pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré après centrifugation du lysat cellulaire pendant 10 minutes à 10000 g à 4°C. Les protéines ont ensuite été dosées au BCA grâce au kit BC Assay Protein Quantification Small Kit (Uptima) en suivant les instructions du fabricant. Un aliquot de 60 µl de lysat et 20 µl de SB4x, correspondant aux protéines totales, a été stocké à -80°C.

II.5.1.2. Immunoprécipitation

Afin de purifier une plus grande quantité de cofiline phosphorylée, plusieurs boîtes de cellules ont été transfectées. Pour chaque échantillon, 100 µl de billes 6His (TALON® Metal Affinity Resin, Clontech) ont été centrifugées 2 minutes à 900 g. Le surnageant a été retiré puis les billes ont été rincées deux fois avec 500 µl de tampon de lyse 1X pH 8 sans EDTA et sans inhibiteurs. La seconde fois, le tampon a été laissé et les billes ont été mises à incuber sur la roue à 4°C pendant 1 heure. Les billes ont ensuite été lavées deux fois avec le tampon de lyse puis les lysats ont été ajoutés aux billes qui ont été incubées 2 heures à 4°C sur roue avant d'être lavées deux fois avec le tampon de lyse et 3 fois avec le tampon de phosphorylation (50 mM HEPES/NaOH à pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 5 mM imidazole pH 8, 1 mg/ml leupeptine et 1 mM PMSF). Après le dernier lavage, le tampon de lyse a été retiré à la seringue Hamilton. Afin d'éluer les protéines interagissant avec les billes 6His, une solution

d'imidazole à 400 mM pH 8 diluée dans le tampon de phosphorylation a été préparée et 50 µl de cette solution a été ajoutée à chaque échantillon. Ces derniers ont ensuite été incubés 30 minutes dans la glace, puis centrifugés 5 minutes à 11000 g. Le surnageant a été récupéré à la seringue Hamilton. Les échantillons de cofiline purifiée obtenus ont été regroupés puis aliquotés et stockés à -80°C.

III. Etude fonctionnelle

III.1. Culture cellulaire et différenciation

Les SH-SY5Y (CRL-2266, ATCC®) sont des cellules de neuroblastomes humains qui constituent un modèle pour étudier les phases initiales de la différenciation neuronale lorsqu'elles sont exposées à l'acide rétinoïque (de Bittencourt Pasquali et al., 2014) (Figure 32). Elles ont été cultivées dans des flasques de 75 cm² (353136, Falcon™) en présence de DMEM Glutamax 4,5 g/L glucose (Invitrogen™) supplémenté avec 10 % de SVF non inactivé dans un incubateur à 37°C ayant une atmosphère à 5 % de CO₂ saturée en humidité. Une partie des SH-SY5Y est adhérente, l'autre est flottante. Les cellules étaient repiquées lorsqu'elles atteignaient entre 60 et 70 % de confluence. Le surnageant était centrifugé 5 minutes à 130 g pour récupérer les cellules flottantes tandis que les cellules adhérentes étaient décollées avec 1 ml de trypsine 0,25 % 0,53 mM d'EDTA (Invitrogen™). La moitié du milieu était ensuite changée tous les deux ou trois jours.

Pour être différenciées, environ 200 000 SH-SY5Y ont été repiquées dans des plaques 6 puits préalablement traités avec 1 ml de collagène R 0,2 % (Pan™ biotech) dilué au 1/200^e puis rincés deux fois avec du PBS 1X. Au bout de 24h, les cellules ont été traitées avec 1 ml d'acide rétinoïque 10 µM dilué dans du DMEM Glutamax 4,5 g/L pour un volume final de 5 ml, dont la moitié a été changée tous les trois jours. Les cellules ont été observées à J0, J3 et J6 afin d'évaluer les modifications morphologiques.

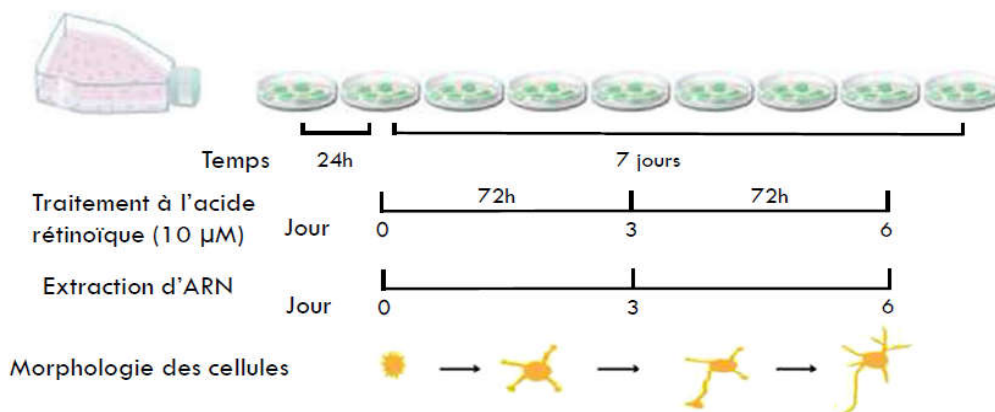


Figure 32 : Différenciation des SH-SY5Y, d'après Pasquali et al., 2014.

III.2. Analyse de la différenciation des cellules

III.2.1. Extraction des ARN

A 0, 3 et 6 jours de culture, les ARN des SH-SY5Y ont été extraits au TRIzol® (Invitrogen™), dans la glace et en conditions RNase-free afin d'éviter toute dégradation de l'ARN. Pour chaque puits, 400 µl de TRIzol® ont été utilisés. Les ARN ont ensuite été extraits à l'aide du kit Direct-zol™ RNA miniprep (Zymo Research) en suivant les instructions du fournisseur.

III.2.2. RT-PCR

La transcription inverse a été réalisée avec le kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) selon les instructions du fabricant. L'expression des gènes *GAP43* (Growth Associated Protein 43), marqueur de la différenciation, et *actine* ont ensuite été étudiés par PCR. Les amorces utilisées pour l'amplification de *GAP43* ont été utilisées par Shiohira et collaborateurs (Shiohira et al., 2012). Le mélange réactionnel de la PCR se compose de 25 µl contenant 1 µl d'ADNc, 5 µl de tampon 5X, 1,5 µl de MgCl₂, 1,25 µl de dNTP (Invitrogen™), 1,25 µl de chaque amorce (Tableau 9) et 0,2 µl de Taq (GoTaq DNA Polymerase, Promega). L'amplification a été réalisée dans un thermocycler Biorad iCycler pendant 30 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation des amorces sur l'ADN cible à 60°C et 30 secondes d'élongation à 72°C. Ces 35 cycles ont été précédés d'une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C et suivis d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de GAP43 et de l'actine

Gène		Séquence des amorces (5'-3')	Longueur du fragment
<i>GAP43</i>	Sens F	CTGTCCTTTCCCACCCACTA	267
	Sens R	GAACGGAACATTGCACACAC	
<i>Actine</i>	Sens F	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	147
	Sens R	TGATCCACATCTGCTGGAAG	

La vérification du produit de PCR a été effectuée par migration des produits de PCR sur gel d'agarose (Eurobio) à 1,2 % dans du tampon TAE 1X (Euromedex). L'expression relative de *GAP43* a ensuite été mesurée grâce au logiciel ImageJ.

IV. Analyse bio-informatique

IV.1. Recherche du domaine PP1i de LIMK2 chez les primates

Au cours de la thèse précédente (Tastet, 2012), il a été montré que le domaine PP1i de LIMK2 n'était retrouvé que chez certains primates. Afin d'affiner ces résultats, nous avons extrait une séquence humaine de référence composée des 100 premiers nucléotides de l'exon 16-1 de LIMK2-1 et des 100 derniers nucléotides de l'intron précédent (Figure 33) à partir du site UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>). Nous avons ensuite utilisé cette séquence pour effectuer un blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/Blast.cgi>) sur le génome de différentes espèces représentatives des différentes branches des primates (Figure 34).

```
>Domaine PP1i (Homo sapiens)
ggcggacagcggcaccgcggggggcgcgcgcttgcgcccccgccccggccccaggcc
agcagtgggcgccaaggaccacgcacatctactttcagAGCCCCCCCCGGGGCCGCAGGAG
AGGGCCCCGGGCTGCGCGGATGATGAGGGCCAGTGAGGCGCCAAGGGAAGGTACCCATCA
AGTATGACCCCAAGGAGCTA
```

Figure 33 : Séquence du domaine PP1i de *LIMK2-1* humaine
Représentation de la séquence intronique (en minuscules) et exonique (en majuscules) du domaine PP1i de *LIMK2-1* humaine ayant servi à identifier les séquences des autres espèces.

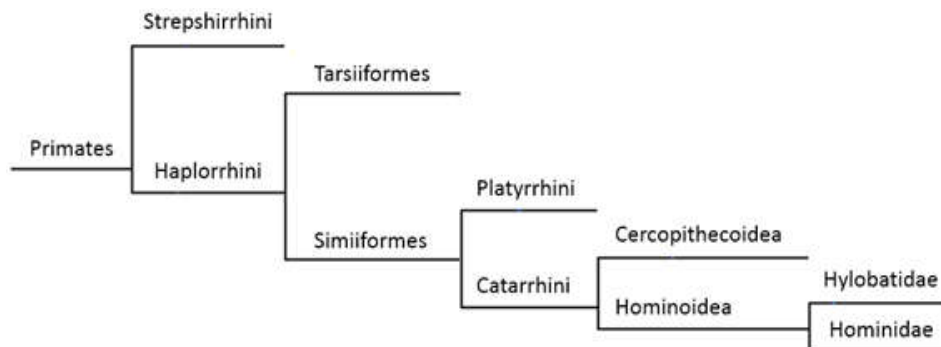


Figure 34 : Arbre phylogénétique des primates

Les haplorrhiniens forment une branche monophylétique dans l'arbre phylogénétique des primates. Ils incluent les tarsiiformes, les simiiformes ou anthropoïdes, qui se divisent à leur tour en platyrrhiniens, ou singes du nouveau monde, et catarrhiniens. Les cercopithecoidés forment une famille de primates à queue non préhensible de l'ancien monde tandis que les hominoïdés regroupe les singes sans queue dont font partie les hylobatidés et les grands primates (hominidés).

Nous avons ainsi comparé notre séquence au génome du tarsier (tarsiiforme), du singe rhésus et du babouin (cercopithécoidés), du gibbon (hylobatidé), de l'orang-outan, du gorille

et du chimpanzé (hominidés). Les localisations génomiques des séquences obtenues ont été comparées au locus du gène *LIMK2* pour chacune de ces espèces, présenté sur la base de données Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

IV.2. Logiciels d'évaluation des conséquences fonctionnelles de mutations

L'impact potentiel du variant p.S668P a été analysé grâce à deux logiciels : Polyphen2 et Mutation Taster. Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) est un outil qui permet de prédire l'impact d'une substitution d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine. Il utilise deux bases de données, HumDiv et HumVar3, compilant ainsi plusieurs milliers de variations pathogènes et non pathogènes. Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), quant à lui, utilise les bases de données 1000Genomes et ExAC et analyse la conservation du nucléotide modifié au cours de l'évolution.

Résultats

I. Etude d’expression de LIMK2-1

I.1. Une isoforme spécifique des hominidés

Trois isoformes de LIMK2 ont été identifiées chez l’homme : LIMK2-2a, LIMK2-2b et LIMK2-1. Les deux premières sont conservées au cours de l’évolution. LIMK2-2a correspond à l’isoforme canonique, retrouvée dès la duplication du gène ancestral *LIMK*, suite à l’apparition des téléostomiens il y a 455 millions d’années. L’isoforme LIMK2-2b, moins étudiée, est présente notamment chez la souris, chez le rat et chez l’homme.

L’isoforme LIMK2-1 utilise un exon issu de la duplication du gène *PPP1R14B*, codant la protéine PHI-1, entre les exons 15 et 16 du gène *LIMK2*. La séquence dupliquée de *PPP1R14B* a été observée pour la première fois au niveau du gène *LIMK2* par Kedra et collaborateurs en 1998, et était alors considérée comme un pseudogène (Kedra et al., 1998). Nous avons confirmé la présence de cette séquence entre les exons 15 et 16 du gène *LIMK2* en comparant par blastn la séquence codante de *PPP1R14B* (NM_138689.2) et celle de l’intron localisé entre les exons 15 et 16 de *LIMK2* (NM_001031801).

```

Homo sapiens domaine PP1i      ggcggacagcggccacccgccccggggggcgggcgttggcgggccccggccccggccccaggcc
Pan troglodytes                GCGGGACAGCGGCACCGCGGGGGGCGCGGCGTTG-----GCGGCCCGGCCCCAGGCC
Gorilla gorilla               GCGGGACAGCGGCACCGCGGGGGGCGCGGCGTTG-----GCGGCCCGGCCCCAGGCC
Pongo abelii                   -----
Homo sapiens domaine PP1i      aggcagtggcgcccaaggaccacgcacatctactttcagAGCCCC-CCCGGGCCCGCAGGA
Pan troglodytes                AGGCAGTGGCGGCCCAGGACCACGCATCTACTTTTCAGAGCACCCCGGGGCGCGCAGGA
Gorilla gorilla               AGGCAGTGGCGGCCCAGGACCACGCATCTACTTTTCAGAGCCCC--CCTGGGGCCCGCAGGA
Pongo abelii                   -----TGGCAGCCCGGACCACACATCTGCTTTTCAGAGC--GCCCGGGGCGCGCAGGA
                                ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
Homo sapiens domaine PP1i      GAGGGCCCGGGCTGCGCGGATGATGAGGGCCAGTGAGGCGCCAAGGGAAGGTCAACATC
Pan troglodytes                GAGGGCCCGGGCTGCGCGGATGATGAGGGCCAGTGAGGCGCCAAGGGAAGGTCAACATC
Gorilla gorilla               GAGGGCCCGGGCTGCGCGGATGATGAGGGCCAGTGAGGCGCCAAGGGAAGGTCAACATC
Pongo abelii                   GAGGGCCCGGGCTGCGCGGATGATGAGGGCCAGTGAGGCGCCAAGGGAAGGTCAACATC
                                ***** ** *****
Homo sapiens domaine PP1i      AAGTATGACCCCAAGGAGCTA
Pan troglodytes                AAGTATGACCCCAAGGAGCTA
Gorilla gorilla               AAGTATGACCCCAAGGAGCTA
Pongo abelii                   AAGTATGACCACAAGGAGCTA
                                ***** ** *****

```

Figure 35 : Alignement de la séquence de référence d’*Homo sapiens* avec les séquences des autres hominidés

Les lettres en minuscule correspondent à la séquence intronique et celles en majuscule à la séquence exonique sur la séquence de référence. Les séquences comparées sont celles de l’orang-outan (*Pongo abelii*, NW_002891525.1), du gorille (*Gorilla gorilla*, NC_018446.1) et du chimpanzé (*Pan troglodytes*, NC_006489.3). Les séquences ont été alignées grâce au logiciel Clustal O (1.2.1).

Nous avons voulu estimer l'époque à laquelle cette duplication est apparue dans le génome. Pour cela, nous avons comparé une séquence composée des 100 premiers nucléotides de l'exon 16-1 de LIMK2-1 chez l'homme et des 100 derniers nucléotides de l'intron précédent (Figure 33) au génome de plusieurs primates. Au locus de *LIMK2*, cette séquence était absente chez le tarsier (tarsiiforme), le singe rhésus, le babouin (cercopithécoidés), et le gibbon (hylobatidé). Elle a été retrouvée chez l'orang-outan, le gorille et le chimpanzé (hominidés) et est très conservée chez ces espèces (Figure 35). La duplication aurait donc eu lieu suite à la division entre la branche des hylobatidés et celle des hominidés (Figure 34), qui aurait eu lieu il y a environ 17 millions d'années (Raaum et al., 2005).

L'expression de LIMK2-2a et LIMK2-2b est bien décrite dans la littérature. Les deux isoformes sont exprimées dans la plupart des tissus, à l'exception des cellules gliales, des glomérules rénaux et des spermatozoïdes (Acevedo et al., 2006). Il existe des différences d'expression entre LIMK2-2a, qui est exprimée plus fortement dans le foie, le colon et l'estomac, et LIMK2-2b, qui apparaît davantage dans le cerveau, les reins et le pancréas (Ikebe et al., 1997; Nomoto et al., 1999). En 2011, Croft et collaborateurs ont montré que le transcrite de l'isoforme LIMK2-1 était exprimé dans la lignée de cellules humaines d'ostéosarcomes Saos-2 (Croft et al., 2011). Il s'agit de la première mention dans la littérature de l'isoforme LIMK2-1, et de la seule connue au début de cette thèse.

La présence exclusive de LIMK2-1 chez les hominidés limite l'étude de son expression. Les modèles étudiés habituellement, tels que le rat ou la souris, ne peuvent pas être utilisés. Par conséquent, nous avons étudié l'expression de LIMK2-1 dans des lignées cellulaires humaines et dans des échantillons d'ADNc et de protéines de tissus humains fournis par Clinisciences. L'ensemble de ces données sont présentées dans l'article « LIMK2-1 is a hominidae-specific isoform of LIMK2 expressed in central nervous system and associated with intellectual disability », soumis dans Neuroscience (partie IV des résultats).

I.2. Transcription de LIMK2-1 dans le système nerveux central

Au cours de la thèse précédente (Tastet, 2012), une variation de l'isoforme LIMK2-1 a été associée à la déficience intellectuelle (partie IV des résultats). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de LIMK2-1 dans le système nerveux central. Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression de l'ARNm de LIMK2-1 dans le cerveau fœtal et dans

le cortex, l’hippocampe et le cervelet adultes humains, les gènes exprimés dans ces trois dernières régions et/ou au cours du neurodéveloppement étant susceptibles d’être impliqués dans la cognition. Les cDNA issus du cerveau fœtal et du cortex, de l’hippocampe et du cervelet adultes humains ont été amplifiés avec des amorces spécifiques de l’isoforme LIMK2-1, localisés sur les exons 15 et 16-1 (Figure 36A). Le transcrite de LIMK2-1 s’exprime dans chacun des échantillons étudiés (Figure 36B). Les produits de PCR ont ensuite été séquencés et correspondent bien à la région de LIMK2-1 attendue.

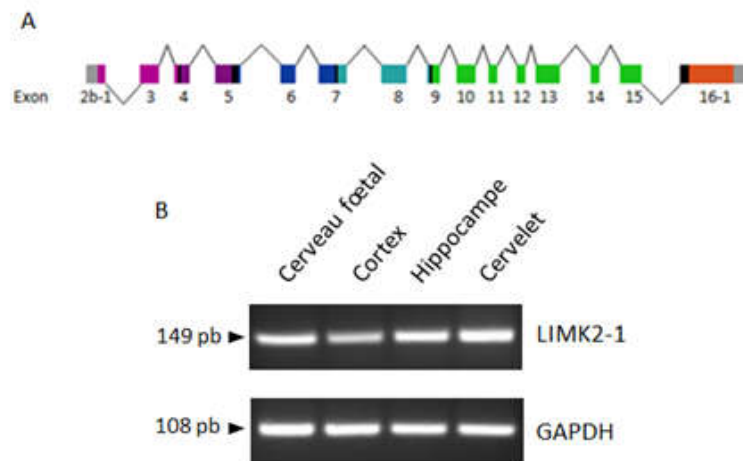


Figure 36 : Expression des ARNm de LIMK2-1

(A) Diagramme de l’ARN pré-messager de LIMK2-1 et (B) expression de l’ARNm de LIMK2-1 et de la GAPDH dans le cerveau fœtal, dans le cortex, l’hippocampe et le cervelet adultes humains.

I.3. Expression de la protéine LIMK2-1

Un anticorps dirigé contre le peptide DKIRAMQKLSTPQKK, localisé au niveau de l’extrémité C-terminale du domaine PP1i de LIMK2-1, a été synthétisé et purifié par Eurogentec (Figure 29). Dans un premier temps, nous avons voulu valider la spécificité de l’anticorps. Pour cela, nous avons tout d’abord surexprimé LIMK2-2b ou LIMK2-1 marqués par une séquence hémagglutinine (HA) dans des cellules HEK. Nous avons ensuite effectué un Western blot en utilisant l’anticorps anti-HA, qui nous a permis de situer la masse moléculaire attendue pour HA-LIMK2-1 à environ 75 kDa.

Par la suite, l’anticorps anti-PP1i a été utilisé en Western blot sur des lysats de cellules HEK transfectées par HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1, de HEK et de NSC-34 non transfectées. La protéine HA-LIMK2-1 est bien surexprimée dans l’échantillon de HEK transfecté, à la masse

moléculaire attendue, ce qui nous a permis de valider l'anticorps. Nous avons également montré l'expression de la protéine LIMK2-1 dans des lignées cellulaires humaines pour la première fois. En effet, LIMK2-1 endogène, dont la masse moléculaire est inférieure de quelques kDa à celle de LIMK2-1 étiqueté HA, est observée à la fois dans les cellules HEK transfectées par HA-LIMK2-2b et dans les HEK non transfectées. Elle n'est pas observée dans la lignée murine NSC-34, ce qui est cohérent avec les données bio-informatiques montrant qu'il s'agit d'une isoforme spécifique d'un sous-groupe des primates (Figure 37).

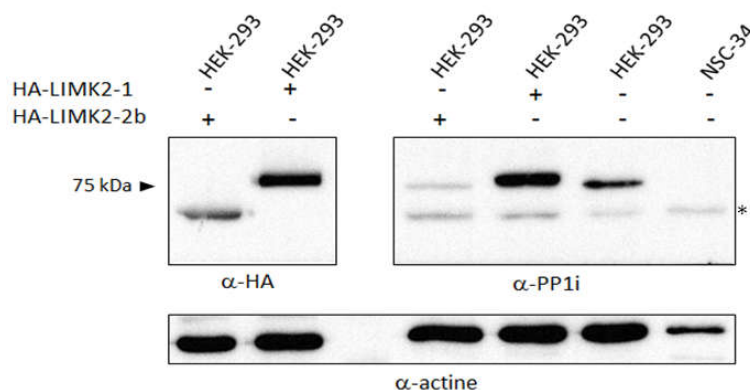


Figure 37 : Validation de l'anticorps anti-PP1i

Western blot anti-HA, anti-PP1i et anti-actine sur les lysats de HEK transfectés par HA-LIMK2-2b ou HA-LIMK2-1 et sur les lysats non transfectés de HEK et de NSC-34. (* : Bande non spécifique révélée par l'anticorps).

Dans un second temps, nous avons étudié l'expression de la protéine LIMK2-1 dans le cerveau fœtal et le cortex, l'hippocampe et le cervelet adultes humains. Pour cela, un Western blot a été effectué sur des échantillons de protéines de cerveau humain. Afin de visualiser la masse moléculaire de la protéine, des lysats de cellules HEK transfectées ou non par LIMK2-1 étiquetée par HA ont été analysés en parallèle (Figure 38). Nous avons ainsi montré que la protéine LIMK2-1 est exprimée dans le cerveau fœtal et dans le cortex adulte. Son expression est plus faible dans le cervelet et quasiment inexistante dans l'hippocampe. Nous observons également des protéines à des masses moléculaires différentes de 75 kDa. Ces protéines pourraient correspondre à LIMK2-1 présentant des modifications post-traductionnelles ou à d'autres protéines possédant un domaine PP1i. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les échantillons de cerveau adulte proviennent de personnes d'âges très différents. En effet, si les échantillons de cortex et de cervelet ont été prélevés chez des personnes de 26 ans, ceux d'hippocampe sont issus d'une personne de 82 ans. L'expression de LIMK2-1 pourrait varier

au cours de la vie. Ces résultats ne permettent donc pas de conclure définitivement quant à l'expression de LIMK2-1 au niveau de l'hippocampe.

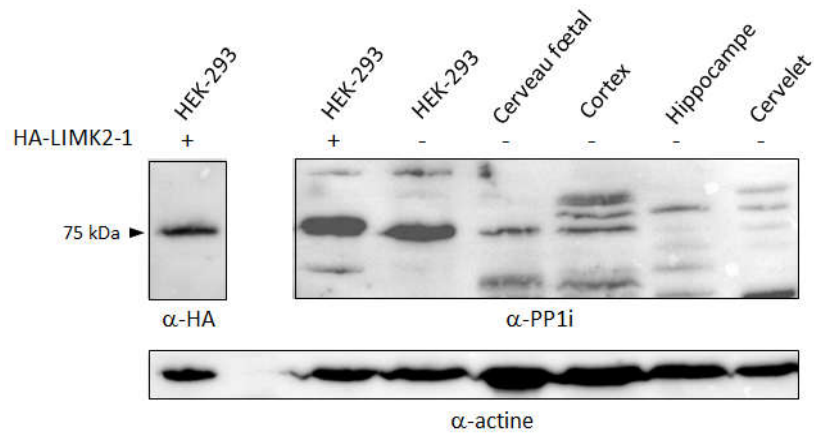


Figure 38 : Expression de la protéine LIMK2-1 dans le SNC
Western blot anti-HA, anti-PP1i et anti-actine sur les lysats de cellules HEK transfectées par HA-LIMK2-1, sur les lysats de HEK non transfectées et sur les échantillons de protéines totales de cerveau fœtal et de cortex, d'hippocampe et de cervelet adultes humains.

II. Etude moléculaire de LIMK2-1

II.1. Structure de LIMK2-1 et hypothèse

Les données présentées dans ce chapitre font l’objet d’une publication en cours de rédaction sur les isoformes de LIMK2, écrite en collaboration avec le Dr. Vallée. Nous avons déjà vu qu’il existait trois isoformes de LIMK2 chez l’homme : LIMK2-2a, LIMK2-2b et LIMK2-1. Les trois formes possèdent deux domaines LIM, dont un premier domaine tronqué pour LIMK2-2b et LIMK2-1, un domaine PDZ, un domaine S/P et un domaine kinase. La région N-terminale de LIMK2-1 est identique à celle de LIMK2-2b. La région C-terminale de LIMK2-1 possède un domaine kinase tronqué de quelques acides aminés et un domaine putatif inhibiteur de la phosphatase 1 (PP1i) (Figure 39).

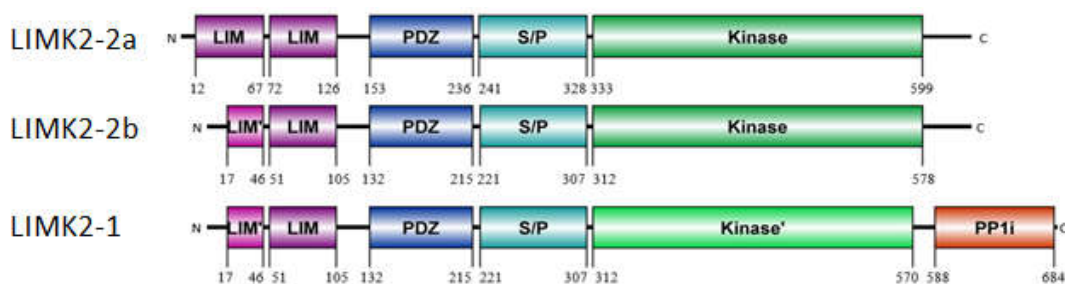


Figure 39 : Isoformes de LIMK2 chez l’homme

Les couleurs correspondent aux différents domaines de la protéine. Le rose et le violet sont pour les domaines LIM’ et LIM, respectivement, le bleu est pour le domaine PDZ, le bleu clair pour le domaine S/P, le vert pour le domaine kinase (foncé pour LIMK2-2a et LIMK2-2b, clair pour LIMK2-1) et l’orange pour le domaine PP1i. Les bornes des domaines proviennent de la base de données Pfam *via* Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

Le domaine kinase de LIMK2 catalyse la phosphorylation de la cofiline sur sa sérine 3 et, par conséquent, l’inhibition de la dépolymérisation de l’actine. Lorsque LIMK2 est surexprimée dans les cellules, la cofiline n’est plus capable de dépolymériser l’actine et une accumulation de fibres de stress est observée (Maekawa et al., 1999; Sumi et al., 2001a; Vallée et al., 2012). Nous avons supposé que le domaine kinase de l’isoforme LIMK2-1 agissait de la même façon.

Par ailleurs, la comparaison des séquences par blastp sur le site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nous a permis de voir que le domaine PP1i partageait

93 % d'identité avec la protéine PHI-1 (PPP1R14B). Afin d'illustrer ce résultat, nous avons aligné les séquences de la protéine PHI-1 entière et du domaine PP1i grâce au logiciel Clustal O (Figure 40).

```

PHI-1                               MADSGTAGGAALAAPAGPGSGGPGPRVYFQSPPGAAGEGPGGADDEGPFVRRQGKVTVKY
Domaine PP1i (LIMK2-1)           -----VRRQGKVTIKY
                                  *****;**

PHI-1                               DRKELRKRLNLEEWILEQLTRLYDCQEEEIPELEIDVDELDDMESDDARAARVKELLVDC
Domaine PP1i (LIMK2-1)           DPKELRKHLNLEEWILEQLTRLYDCQEEEISELEIDVDELDDMESDDAWASRVKELLVDC
* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
                                  *:*****

PHI-1                               YKPTAEAFISGLLDKIRGMQKLPSTPQKK
Domaine PP1i (LIMK2-1)           YKPTAEAFISGLLDKIRAMQKLPSTPQ--
                                  *****:*****
    
```

Figure 40 : Comparaison des séquences de PPP1R14B et du domaine PP1i de LIMK2-1
 Les séquences de PPP1R14B (NM_138689) et de PP1i ont été alignées grâce au logiciel Clustal O (1.2.1). Les bornes du domaine PP1i proviennent de la base de données Pfam via le site Ensembl.

La protéine PHI-1 est une protéine inhibitrice de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Eto et al., 1999). PP1 fait partie des protéines capables de déphosphoryler la sérine 3 de la cofiline (Meberg et al., 1998). L'homologie de séquence entre PHI-1 et le domaine PP1i de LIMK2-1 suggère une homologie de fonction et nous permet de supposer que les deux protéines seraient toutes les deux capables d'inhiber la phosphatase 1.

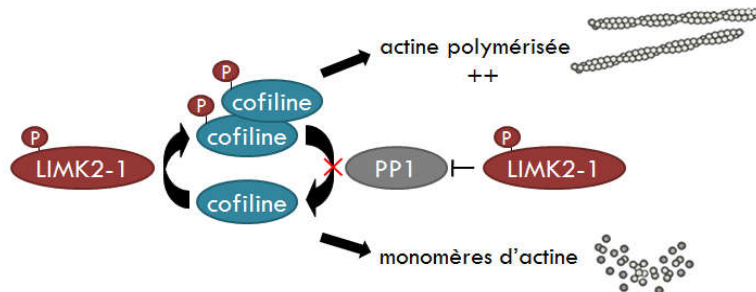


Figure 41 : Modèle hypothétique de fonctionnement de l'isoforme LIMK2-1
 LIMK2-1 devrait, d'une part, phosphoryler la cofiline et, d'autre part, inhiber la phosphatase 1, ce qui empêcherait la déphosphorylation de la cofiline. Ces deux actions combinées entraîneraient une augmentation de la polymérisation de l'actine et donc du nombre de fibres de stress.

Notre hypothèse est donc la suivante : LIMK2-1 devrait, d'une part, phosphoryler la cofiline et favoriser la formation de fibres de stress grâce à son domaine kinase et, d'autre part, empêcher la déphosphorylation de la cofiline par son domaine inhibiteur de la phosphatase 1, ce qui se traduirait par une augmentation de la quantité de fibres de stress

dans les cellules surexprimant LIMK2-1 par rapport aux cellules surexprimant LIMK2-2a ou LIMK2-2b (Figure 41).

II.2. Rôle de LIMK2-1 sur la polymérisation de l'actine

Afin de tester notre hypothèse, nous avons surexprimé dans des cellules HeLa chacune des isoformes de LIMK2, LIMK2-2a tronquée en C-terminal (LIMK2-2a Δ Cter), de façon à avoir le même domaine kinase que LIMK2-1, LIMK2-1 sans domaine PP1i (LIMK2-1 Δ PP1i) et LARP6, toutes étiquetées par HA (Figure 42). Les cellules surexprimant HA-LIMK2-2a ou HA-LIMK2-2b correspondent à notre témoin positif et celles transfectées par HA-LARP6 sont notre témoin négatif. La construction HA-LIMK2-2a Δ Cter nous a permis d'évaluer l'impact de la délétion de la région C-terminale, qui inclut quelques résidus du domaine kinase et la région C-terminale en aval du domaine kinase, sur la formation des fibres de stress. La construction HA-LIMK2-1 Δ PP1i nous a permis d'étudier l'impact de l'absence du domaine PP1i.

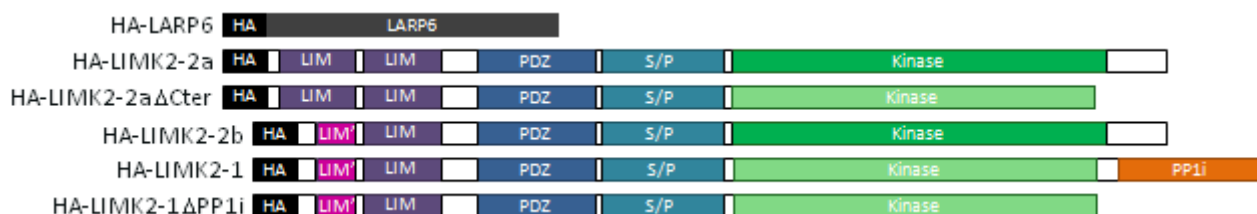


Figure 42 : Constructions utilisées pour l'étude de la polymérisation de l'actine
 HA-LARP6 correspond au témoin négatif. HA-LIMK2-2a et HA-LIMK2-2b sont les témoins positifs. LIMK2-2a Δ Cter correspond à l'isoforme LIMK2-2a délétée de l'extrémité C-terminale absente de l'isoforme LIMK2-1 et LIMK2-1 Δ PP1i correspond à l'isoforme LIMK2-1 sans son domaine PP1i.

Nous avons fixé les cellules 48h après transfection puis, après avoir identifié les cellules transfectées par immunocytochimie anti-HA, nous avons analysé la polymérisation de l'actine à l'aide de phalloïdine couplée à un fluorochrome. Les cellules ont été observées en microscopie confocale. Pour chaque condition, des photos ont été prises tous les 0,6 μ m sur toute l'épaisseur de la cellule, puis les plans obtenus ont été fusionnés pour former une image montrant les fibres de stress présentes dans toute la cellule. Sur les images obtenues, nous avons pu distinguer 4 catégories. Dans la catégorie 1, les fibres de stress sont nombreuses, présentes dans plusieurs plans de la cellule et se superposent sur l'image. Elles peuvent être cytoplasmiques et/ou à la périphérie de la cellule. Dans la catégorie 2, les fibres de stress sont

moins nombreuses, elles ne sont pas présentes sur tous les plans mais parcourent toute la cellule. Dans la catégorie 3, quelques fibres de stress sont observées. La catégorie 4 correspond à une absence de fibres de stress (Figure 43).

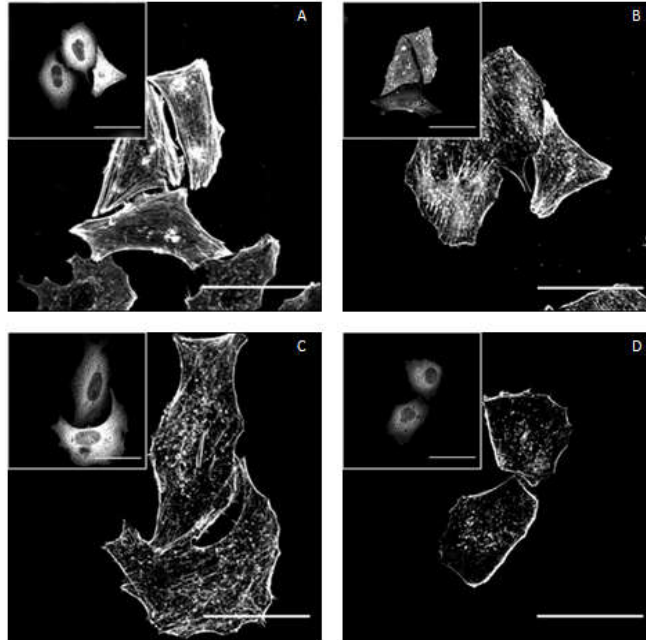


Figure 43 : Catégories observées de fibres de stress

Observation en microscopie confocale des fibres de stress dans des cellules HeLa. Les fibres de stress sont classées en 4 catégories : nombreuses et présentes dans plusieurs plans de la cellule (catégorie 1) (A), nombreuses mais pas présentes sur tous les plans (catégorie 2) (B), éparses (catégories 3) (C) et absentes (catégorie 4) (D). Echelle : 50 µm.

Les cellules ont été comptées suite à 4 expériences indépendantes, qui ont permis d'obtenir des résultats comparables. Les données pour chaque catégorie des 4 expériences ont ensuite été additionnées (Figure 44) et les catégories ont été comparées entre elles. Lorsque les cellules sont transfectées par HA-LARP6, qui correspond à notre témoin négatif, 78 % des cellules ne présentent aucune fibre de stress (catégorie 4) et 17 % présentent quelques fibres éparses (catégorie 3). Les cellules transfectées par HA-LIMK2-2a ou HA-LIMK2-2b présentent respectivement 80 et 67 % de cellules avec des fibres de stress présentes sur tous les plans de la cellule (catégorie 1), et 14 et 21 % de cellules présentant des fibres de stress nombreuses mais non superposées (catégorie 2). De manière surprenante, lorsque les cellules sont transfectées par HA-LIMK2-1, le nombre de fibres de stress présentes sur tous les plans de la cellule est seulement de 10 % (catégorie 1). Nous observons néanmoins 36 % de cellules présentant des fibres de stress le long du cytoplasme mais

seulement sur certains plans (catégorie 2) et 21 % de cellules ne présentant que quelques fibres de stress éparses (catégorie 3). Enfin, lorsque les cellules sont transfectées par les constructions HA-LIMK2-2a Δ Cter ou HA-LIMK2-1 Δ PP1i, le nombre de cellules présentant des fibres de stress éparses (catégorie 3) est augmenté par rapport aux cellules transfectées par HA-LIMK2-1 (24 et 33 %, respectivement), de même que le nombre de cellules ne présentant aucune fibre de stress (55 et 45 %, respectivement).

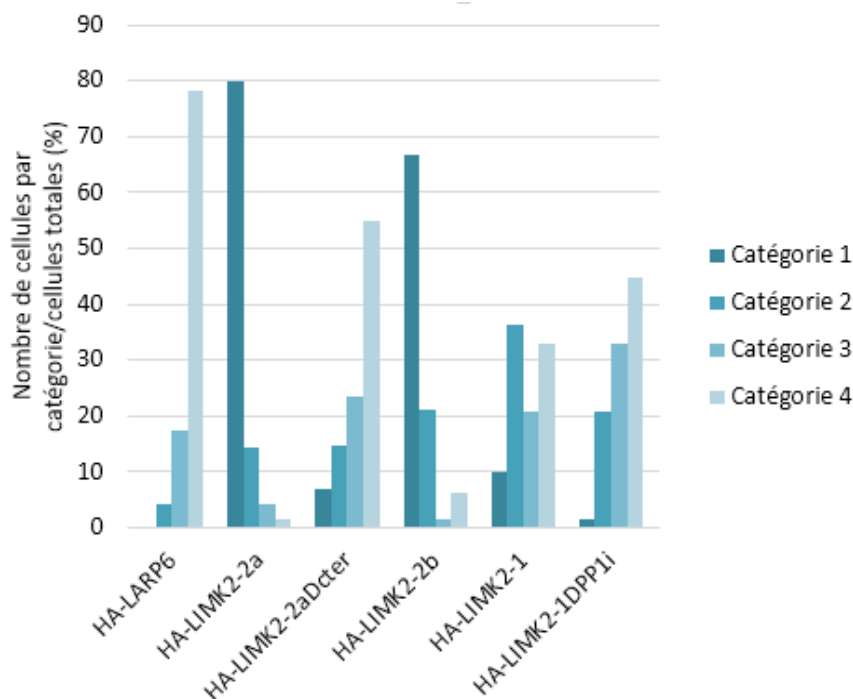


Figure 44 : Représentation graphique des proportions de cellules de chaque catégorie. La proportion de cellules par catégorie est montrée pour chaque condition, c'est-à-dire pour chaque transfection. Les catégories représentées correspondent aux cellules présentant des fibres de stress nombreuses et présentes dans plusieurs plans de la cellule (catégorie 1), nombreuses mais non superposées (catégorie 2), éparses (catégories 3) et absentes (catégorie 4).

La proportion de cellules de chaque catégorie semble différer en fonction de la construction transfectée. Afin d'évaluer cette différence, nous avons comparé les profils de fibres de stress par condition de transfection deux à deux (Tableau 10). Nous n'observons pas de différence significative entre les catégories des cellules transfectées par HA-LIMK2-2a et celles transfectées par HA-LIMK2-2b, qui correspondent toutes les deux à notre témoin positif. Les cellules transfectées par HA-LARP6, qui correspond à notre témoin négatif, présentent un profil de fibres de stress différent des cellules transfectées par chacune des

autres constructions : HA-LIMK2-2a, HA-LIMK2-2aΔCter, HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1 et HA-LIMK2-1ΔPP1i. Chacune de ces constructions devrait donc avoir un rôle dans la formation des fibres de stress, indépendant de l'expérience de transfection.

Tableau 10 : Comparaison des profils de fibres de stress en fonction des transfactions
 Les conditions de transfection ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher suivi d'une correction pour tests multiples. La p value obtenue est indiquée en haut à droite du tableau. La significativité du test apparaît dans la partie située en bas à gauche du tableau (* : $p < 2,38E-03$; ** : $p < 9,52E-04$; *** : $p < 4,76E-04$; **** : $p < 4,76E-05$; NS : non significatif).

	HA-LARP6	HA-LIMK2-2a	HA-LIMK2-2aΔCter	HA-LIMK2-2b	HA-LIMK2-1	HA-LIMK2-1ΔPP1i
HA-LARP6		p=6.38E-39	p=7.96E-04	p=6.74E-33	p=6.89E-12	p=3.03E-05
HA-LIMK2-2a	****		p=5.72E-26	p=2.26E-01	p=1.62E-20	p=3.03E-26
HA-LIMK2-2aΔCter	**	****		p=9.77E-21	p=2.62E-03	p=1.71E-01
HA-LIMK2-2b	****	NS	****		p=5.39E-15	p=2.50E-21
HA-LIMK2-1	****	****	NS	****		p=1.10E-02
HA-LIMK2-1ΔPP1i	****	****	NS	****	NS	

Une tendance se dégage également de la comparaison du profil des fibres de stress entre les cellules transfectées par HA-LIMK2-1 et celles transfectées par HA-LIMK2-1ΔPP1i, de même qu'entre celles transfectées par HA-LIMK2-1 et celles transfectées par HA-LIMK2-2aΔCter. Nous avons vu que les cellules transfectées par HA-LIMK2-1 présentent un profil de fibres de stress différent de celles transfectées par HA-LIMK2-1ΔPP1i ou par HA-LIMK2-2aΔCter. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative entre ces différentes conditions en prenant en compte une correction pour les tests multiples. Nos résultats montrent néanmoins une tendance, suggérant que le domaine PP1i pourrait jouer un rôle dans le profil observé. La différence semble moins importante entre les cellules transfectées par HA-LIMK2-2aΔCter et celles transfectées par HA-LIMK2-1ΔPP1i. Ces deux constructions sont identiques en C-terminal, où elles possèdent un domaine kinase tronqué, et différent en N-terminal. La première possède deux domaines LIM entiers tandis que la deuxième possède un domaine LIM entier et un domaine LIM tronqué en N-terminal. La différence de profil entre les cellules transfectées par ces constructions et celles transfectées par HA-LIMK2-1 pourrait donc être essentiellement dû au domaine PP1i.

Enfin, une différence significative est observée entre les cellules transfectées par HA-LIMK2-2a et celles transfectées par HA-LIMK2-2aΔCter. Ces deux constructions ne diffèrent que par l'absence du domaine C-terminal, qui inclut quelques acides aminés du

domaine kinase. Cette différence pourrait avoir un impact fort sur la polymérisation de l'actine. En effet, les cellules transfectées par HA-LIMK2-2a présentent dans la majorité des cas des fibres de stress de catégorie 1, tandis que les cellules transfectées par HA-LIMK2-2a Δ Cter ne possèdent que très peu de cellules de catégorie 1 et une majorité de cellules de catégorie 4.

Ces résultats suggèrent que chaque construction, à l'exception du témoin négatif, joue un rôle dans la formation des fibres de stress. Ils ne nous permettent pas de confirmer notre hypothèse de départ, puisque les cellules exprimant LIMK2-1 présentent moins de fibres de stress que celles exprimant LIMK2-2a ou LIMK2-2b. Ils suggèrent néanmoins une implication du domaine PP1i dans la formation des fibres de stress. Enfin, ils posent la question de la fonctionnalité du domaine kinase lorsque celui-ci est tronqué en C-terminal.

II.3. Rôle de LIMK2-1 sur la phosphorylation de la cofiline

Afin d'étudier la fonctionnalité du domaine kinase de LIMK2-1, nous avons transfecté les différentes constructions présentées dans la Figure 42 dans des cellules HEK et nous avons regardé, d'une part, la phosphorylation de la cofiline endogène en fonction de la construction surexprimée et, d'autre part, le rôle de chacune des protéines surexprimées sur la phosphorylation de la cofiline *in vitro*.

Pour mesurer la phosphorylation de la cofiline endogène, nous avons tout d'abord transfecté nos constructions puis lysé les cellules. Nous avons ensuite effectué un Western blot avec les lysats en utilisant un anticorps anti-HA, pour contrôler l'expression de notre construction, un anticorps anti-actine, pour évaluer la quantité de protéines totales déposées sur gel et des anticorps anti-cofiline et anti-phospho-cofiline, afin d'évaluer la phosphorylation de la cofiline en fonction de la construction transfectée.

Lorsque les cellules sont transfectées par HA-LIMK2-2a ou par HA-LIMK2-2b, nous pouvons observer un taux élevé de cofiline phosphorylée par rapport au taux de cofiline total. Ce taux est faible quand les cellules sont transfectées par HA-LARP6, notre témoin négatif. Dans les cellules transfectées par HA-LIMK2-1, HA-LIMK2-2a Δ Cter, HA-LIMK2-1 Δ PP1i, le taux de cofiline phosphorylée est proche de celui observé dans le témoin négatif (Figure 45). Ces

résultats reflètent l'impact de la surexpression des constructions de LIMK2 sur la phosphorylation de la cofiline dans le modèle cellulaire des cellules HEK.

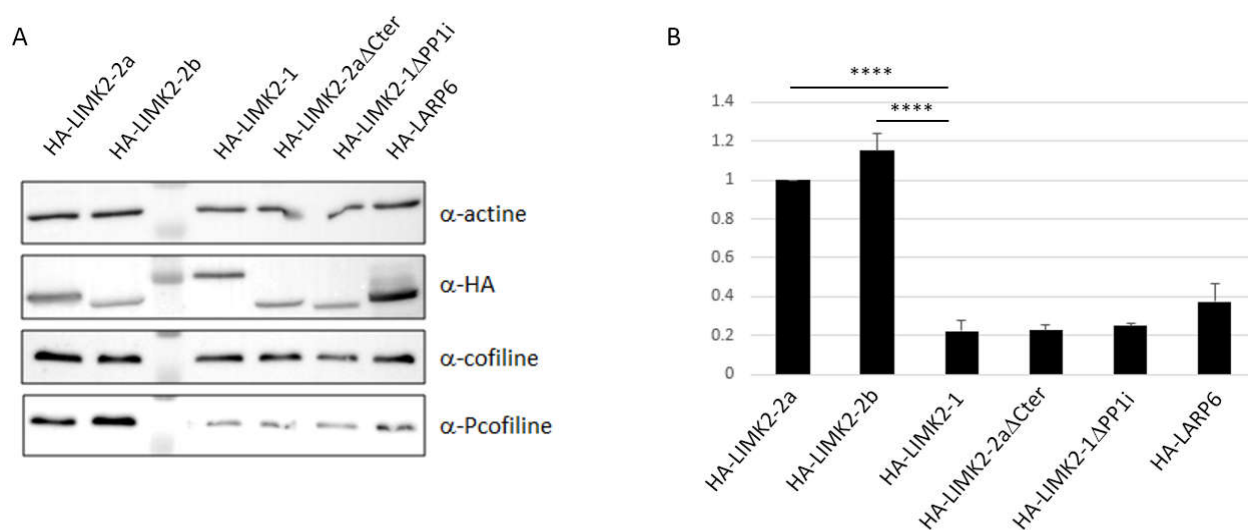


Figure 45 : Phosphorylation de la cofiline *in cellulo*

(A) Western blot anti-actine, anti-HA, anti-cofiline et anti-phospho-cofiline sur les lysats de HEK transfectées par HA-LIMK2-2a, HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1, HA-LIMK2-2aΔCter, HA-LIMK2-1ΔPP1i ou HA-LARP6. (B) Quantification de la cofiline phosphorylée par rapport à la cofiline totale et normalisation par le rapport obtenu pour HA-LIMK2-2a. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SEM. La significativité a été évaluée en utilisant l'analyse de variance one-way ANOVA (**** : $p < 0,001$).

Afin de compléter ces résultats et de nous affranchir de la présence d'autres protéines intracellulaires, nous avons étudié la phosphorylation de la cofiline *in vitro*. Pour cela, nous avons surexprimé chacune des constructions présentées dans la Figure 42 dans des cellules HEK, puis nous avons immunoprécipité les protéines produites grâce à des billes couplées à un anticorps anti-HA. Les protéines fixées aux billes ont ensuite été placées en présence de cofiline purifiée, d'ATP et de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Lorsque les constructions de LIMK2 étaient capables de phosphoryler la cofiline, nous avons pu observer un immunomarquage au $\gamma^{32}\text{P}$, révélé par autoradiographie.

Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus *in cellulo*. HA-LIMK2-2a et HA-LIMK2-2b phosphorylent la cofiline. Nous pouvons également observer que les deux constructions s'autophosphorylent (*). HA-LARP6 ne phosphoryle pas la cofiline, de même que HA-LIMK2-1, HA-LIMK2-2aΔCter et HA-LIMK2-1ΔPP1i (Figure 45).

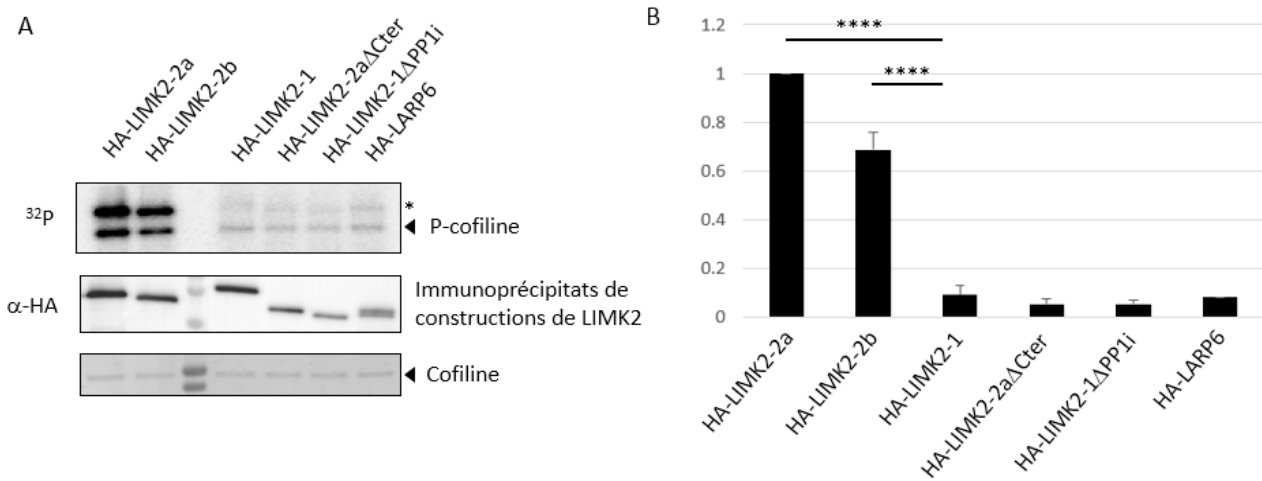


Figure 45 : Phosphorylation de la cofiline *in vitro*

(A) Cofiline phosphorylée au $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP par le test de l'activité kinase de HA-LIMK2-2a, HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1, HA-LIMK2-2aΔCter, HA-LIMK2-1ΔPP1i et HA-LARP6 (* : Autophosphorylation de LIMK2), Western blot anti-HA des immunoprécipitats de chaque construction et visualisation de la cofiline totale au BluePage fermentas. (B) Quantification de la cofiline phosphorylée par rapport à la cofiline totale et normalisation par le rapport obtenu pour HA-LIMK2-2a. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SEM. La significativité a été évaluée en utilisant l'analyse de variance one-way ANOVA (**** : $p < 0,001$).

Ces résultats montrent donc, d'une part, que LIMK2-1 ne phosphoryle pas la cofiline. D'autre part, il semble que cette absence de phosphorylation ne soit pas due à la présence d'un domaine supplémentaire PP1i, qui pourrait en se repliant provoquer un encombrement stérique et empêcher l'isoforme LIMK2-1 d'interagir avec la cofiline et de la phosphoryler. De plus, lorsque l'on retire l'extrémité C-terminale de LIMK2-2a, dont les quelques acides aminés qui ne sont pas dans le domaine kinase tronqué de LIMK2-1, la cofiline n'est pas phosphorylée non plus. L'extrémité C-terminale de LIMK2-2a et 2b jouerait donc un rôle crucial dans la phosphorylation de la cofiline.

II.4. Caractérisation du domaine PP1i

II.4.1. Interaction entre la phosphatase 1 et le domaine PP1i de LIMK2-1

Le domaine PP1i de LIMK2-1 partage 93 % d'identité avec la protéine PHI-1. Nous supposons que si le domaine PP1i de LIMK2-1 agit sur la phosphatase 1 (PP1) de la même

façon que la protéine PHI-1 en l'inhibant, il doit dans un premier temps interagir avec PP1. Nous avons donc testé l'interaction entre PP1 et le domaine PP1i de LIMK2-1. Pour cela, nous avons co-transfecté dans un premier temps PP1 étiquetée Flag avec soit HA-LARP6, soit HA-LIMK2-2a, soit HA-LIMK2-2b, soit HA-LIMK2-1 (Figure 46).

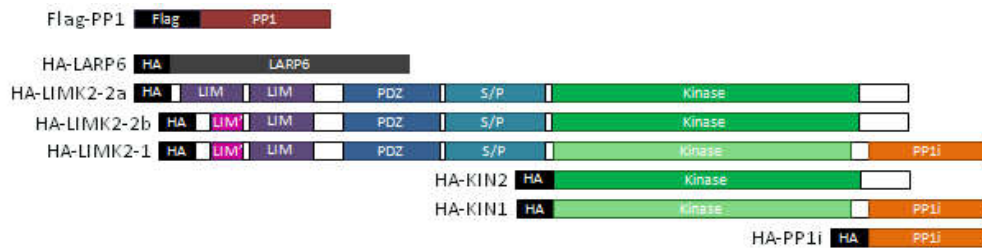


Figure 46 : Constructions utilisées pour l'étude de l'interaction entre PP1 et LIMK2-1 L'interaction a été testée entre Flag-PP1 et HA-LARP6, qui correspond au témoin négatif, HA-LIMK2-2a, HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1, HA-KIN2, HA-KIN1 ou HA-PP1i.

Nous avons ensuite effectué une co-immunoprécipitation anti-Flag et révélé les lysats et les éluats avec un anticorps anti-Flag et un anticorps anti-HA (Figure 47A). Cette première étude a montré que HA-LARP6 n'interagissait pas avec Flag-PP1. En revanche, nous avons mis en évidence une interaction faible entre HA-LIMK2-2a ou HA-LIMK2-2b et Flag-PP1 et une interaction plus forte entre HA-LIMK2-1 et Flag-PP1.

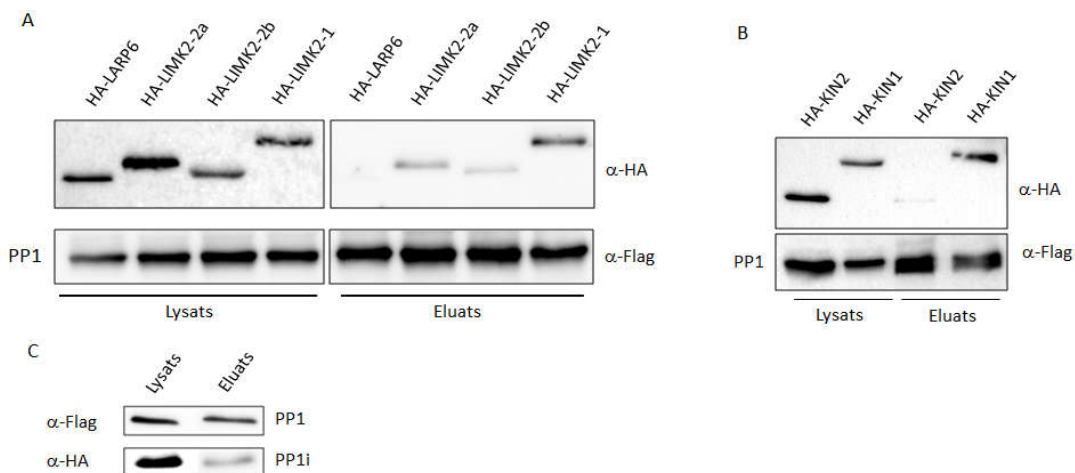


Figure 47 : Interaction entre PP1 étiquetée Flag et les différentes isoformes de LIMK2 Western blot anti-HA et anti-Flag des lysats et des éluats anti-Flag obtenus à partir des co-transfections de Flag-PP1 et soit HA-LARP6, soit HA-LIMK2-2a, soit HA-LIMK2-2b, soit HA-LIMK2-1 (A), Flag-PP1 et soit HA-KIN1, soit HA-KIN2 (B), Flag-PP1 et HA-PP1i (C).

Résultats – Etude moléculaire de LIMK2-1

Dans les cellules de mammifères, il existe environ 40 sérine/thréonine phosphatases, dont fait partie PP1, pour près de 400 sérine/thréonine kinases. Afin d'interagir avec l'ensemble de leurs cibles, la diversité des phosphatases ne s'est pas étendue par duplication génique mais *via* l'interaction avec d'autres protéines qui régulent leurs interactions avec différents substrats (Bollen et al., 2010). Plusieurs sites d'interaction de PP1 avec des partenaires ont été identifiés. Le mieux caractérisé est le site R/K-V/I-X-F (Egloff et al., 1997). Il constitue un motif d'ancrage pour une liaison initiale de PP1 à son partenaire. Une deuxième interaction avec un autre site du partenaire amène la spécificité d'interaction de PP1 avec son substrat (Heroes et al., 2013).

```
>LARP6
MAQSGGEARPGPKTAVQIRVAIQEAEDVDELEDEEEGAETRAGADPARYLSPGWGSAEEEEPSRGRHSSTASGGG
NEREDLEQEWKPPDEELIKKLVDOIIFYFSDENLEKDAFLKHKVRRNKLGYVSVKLLTSFKKVKHLTRDWRRTAH
ALKYSVVLLELNEDHRKVRRTTPVPLFPNENLPSKMLLVYDLYLSPKLWALATPQKNGRVQEKVMEHLLKLFGTG
VISSVRILKPGRELPPDIRRISRYSQVGTQCEAIVEFEEVEAAIKAHEFMITESQGKENMKAVLIGMKPPKKP
AKDKNHDEEPTASIHNLKSLNKRVVEELQYMGDESSANSSSDPESNPTSPMAGRRHAATNKLSPSGHQNLFLSPNA
SPCTSFWSSPLAQRKGVSRKSPLAEEGRNLCSTSPFI FRKCMDYSSDSSVTPSGSPWVRRRRQAEMGTQKSPGT
SPLLSRKMQTADGLFVGVLRPLRPGPDNTRGFHGHRSRACV

>LIMK2-2a
MSALAGEDVWRCPGCGDHIAPSIWIYRTVNETWHGSCFRCSECQDSLNTWYIEKDGKLYCPKDYWGKFGFCHGC
SLLMTGPFMVAGEFKYHPECFACMSCKVI IEDGDAYALVQHATLYCGKCHNEVVLAPMFERLSTESVQEQLPYSV
TLISMPATTEGRRGFVSVESACSNYATTVQVKEVNRMHISPNRRAIHPGDRILEINGTVPVTLRVEEVEDAIS
QTSQTLQLLIEHDPVSRQLDQLRLEARLAPHMQNAGHPHALSTLDTKENLEGTLRRLRSLRRSNSISKSPGSPSPK
EPLLFSDIRSRSESLRCSYSSQIIFRPCDLIHGEVLGKGFPGQAIKVTHKATGKVMVMKELIRCDEETQKTFLT
EVKVMRSLDHPNVLKFI GVLVYDKRKLNLLEYIEGGTLKDFLRSMDFPPWQKVRFAKGIASGMAYLHSMCI IHR
DLNSHNCLIKLDTKTVVADFGLSRLIVEERKRAPMEKATTKKRTLRLKNDKRRKRYTVVGNPYWMAPEMLNGKSYDE
TVDIFSPGIVLCEIIGQVYADPDCPLPRTLDFGLNVKLFWEKFPVTPDCPPAFFPLAAICCRLEPESRPAFASKLEDS
FEALSILYLGELGIPLPAEELELDHTVSMQYGLTRDSPP

>LIMK2-2b
MGSYLSVPAYFTSRDLFRCSECQDSLNTWYIEKDGKLYCPKDYWGKFGFCHGCSLLMTGPFMVAGEFKYHPECF
ACMSCKVI IEDGDAYALVQHATLYCGKCHNEVVLAPMFERLSTESVQEQLPYSVTLISMPATTEGRRGFVSVES
ACSNYATTVQVKEVNRMHISPNRRAIHPGDRILEINGTVPVTLRVEEVEDAISQTSQTLQLLIEHDPVSRQLDQ
LRLEARLAPHMQNAGHPHALSTLDTKENLEGTLRRLRSLRRSNSISKSPGSPSPKEPFLFSDIRSRSESLRCSY
SQIIFRPCDLIHGEVLGKGFPGQAIKVTHKATGKVMVMKELIRCDEETQKTFLTEVKVMRSLDHPNVLKFI GVLV
KDKKLNLLLEYIEGGTLKDFLRSMDFPPWQKVRFAKGIASGMAYLHSMCI IHRDLNSHNCLIKLDTKTVVADFG
LSRLIVEERKRAPMEKATTKKRTLRLKNDKRRKRYTVVGNPYWMAPEMLNGKSYDETVDIFSPGIVLCEIIGQVYAD
PDCPLPRTLDFGLNVKLFWEKFPVTPDCPPAFFPLAAICCRLEPESRPAFASKLEDSFEALSILYLGELGIPLPAEELE
LDHTVSMQYGLTRDSPP

>LIMK2-1
MGSYLSVPAYFTSRDLFRCSECQDSLNTWYIEKDGKLYCPKDYWGKFGFCHGCSLLMTGPFMVAGEFKYHPECF
ACMSCKVI IEDGDAYALVQHATLYCGKCHNEVVLAPMFERLSTESVQEQLPYSVTLISMPATTEGRRGFVSVES
ACSNYATTVQVKEVNRMHISPNRRAIHPGDRILEINGTVPVTLRVEEVEDAISQTSQTLQLLIEHDPVSRQLDQ
LRLEARLAPHMQNAGHPHALSTLDTKENLEGTLRRLRSLRRSNSISKSPGSPSPKEPFLFSDIRSRSESLRCSY
SQIIFRPCDLIHGEVLGKGFPGQAIKVTHKATGKVMVMKELIRCDEETQKTFLTEVKVMRSLDHPNVLKFI GVLV
KDKKLNLLLEYIEGGTLKDFLRSMDFPPWQKVRFAKGIASGMAYLHSMCI IHRDLNSHNCLIKLDTKTVVADFG
LSRLIVEERKRAPMEKATTKKRTLRLKNDKRRKRYTVVGNPYWMAPEMLNGKSYDETVDIFSPGIVLCEIIGQVYAD
PDCPLPRTLDFGLNVKLFWEKFPVTPDCPPAFFPLAAICCRLEPESRAPPAGAGEGPGCADDEGPVRRQGVTKIKYD
PRELRRHLNLEEWILEQLTRLYDCQEEI ISELEIDVDELDMESDDAWASRVKELLVDCYKPTFAFISGLLDRIR
AMQKLS TPQK
```

Figure 48 : Séquences protéiques de LARP6, LIMK2-2a, LIMK2-2b et LIMK2-1

Les séquences ont été obtenues sur la base de données UCSC Genome browser (LARP6 : NM_018357.3 ; LIMK2-2a : NM_005569.3 ; LIMK2-2b : NM_016733.2 ; LIMK2-1 : NM_001031801.1). Les domaines kinases des LIMK apparaissent en vert. La séquence consensus reconnue par PP1 (R/K-V/I-X-F) est soulignée.

Par analyse de séquence, nous avons identifié le motif R/K-V/I-X-F pour chacune des isoformes de LIMK2 étudiée. En revanche, elle n'a pas été retrouvée pour LARP6, qui

constitue donc un bon témoin négatif (Figure 48). Puisque l'interaction entre LIMK2-1 et PP1 semble plus forte que celle entre PP1 et les deux autres isoformes, nous avons supposé que la spécificité de l'interaction provenait d'une interaction entre PP1 et une séquence située dans le domaine PP1i. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons co-transfecté PP1 étiquetée Flag avec le domaine kinase de l'isoforme LIMK2-2a (KIN2), avec le domaine kinase et PP1i de l'isoforme LIMK2-1 (KIN1) ou avec le domaine PP1i seul, tous étiquetés HA. Nous avons ensuite effectué une co-immunoprécipitation anti-Flag et révélé les lysats et les éluats avec un anticorps anti-Flag et un anticorps anti-HA (Figure 47B et C). Ce deuxième travail a confirmé que l'interaction était plus faible entre PP1 et le domaine kinase de LIMK2-2a qu'entre PP1 et les domaines kinase et PP1i de LIMK2-1. Il a également montré que PP1 interagissait avec le domaine PP1i de LIMK2-1.

Nous avons évalué l'effet de la variation grâce aux logiciels Polyphen2 et Mutation Tester. La première analyse montre que la mutation est potentiellement pathogène, avec un score de 0,956 (Figure 50) tandis que la deuxième considère le variant comme un polymorphisme non pathogène.

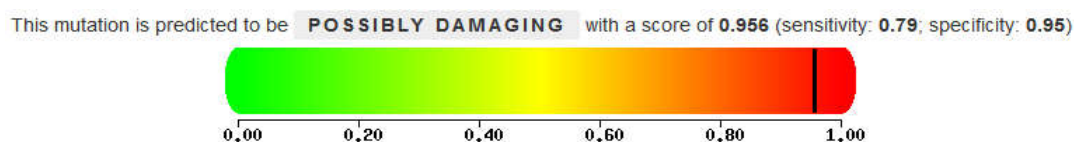


Figure 50 : Evaluation de l'effet de la mutation par le logiciel Polyphen2

La mutation est considérée comme potentiellement pathogène, avec une sensibilité de 0,79 et une spécificité de 0,95. La sensibilité correspond à la capacité d'un test à donner un résultat positif lorsque l'hypothèse est vérifiée et la spécificité mesure la capacité d'un test à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée.

Par ailleurs, le variant a été étudié par une modélisation *in silico* et montre que le changement d'acide aminé pourrait entraîner la disparition d'une boucle de l'hélice α située à l'extrémité C-terminale du domaine PP1i (partie IV des résultats). Afin de compléter ces données bio-informatiques, nous avons étudié l'impact de la mutation p.S668P sur la formation des fibres de stress et sur l'interaction entre la phosphatase 1 et le domaine PP1i.

III.2. Impact moléculaire de la variation p.S668P

III.2.1. Formation de fibres de stress

Nous avons évalué l'impact de la mutation sur la formation des fibres de stress. Pour cela, parallèlement aux transfections décrites dans la partie II.2., nous avons transfecté LIMK2-1S668P étiquetée HA dans des cellules HeLa. Nous avons fixé les cellules 48h après transfection puis, après avoir identifié les cellules transfectées par immunocytochimie anti-HA, nous avons analysé la polymérisation de l'actine l'aide de phalloïdine couplée à un fluorochrome. Nous avons ensuite évalué le nombre de fibres de stress de la même façon que dans la partie II.2 des résultats (Figure 51).

Aucune des cellules transfectées par HA-LIMK2-1S668P ne présentent de fibres de stress sur tous les plans de la cellule (catégorie 1), de manière similaire à celles transfectées par HA-LIMK2-1 Δ PP1i qui n'en présentent que dans 1 % des cas. En revanche, les cellules transfectées par HA-LIMK2-1 présentent des fibres de stress de catégorie 1 dans 10 % des cas.

Résultats – Caractérisation du variant p.S668P

Dans 36 % des cas, les cellules surexprimant HA-LIMK2-1S668P présentent des fibres de stress traversant la cellule mais non superposées (catégorie 2), dans 28 % des cas quelques fibres de stress éparses (catégorie 3) et dans 35 % des cas, aucune fibre de stress (catégorie 4).

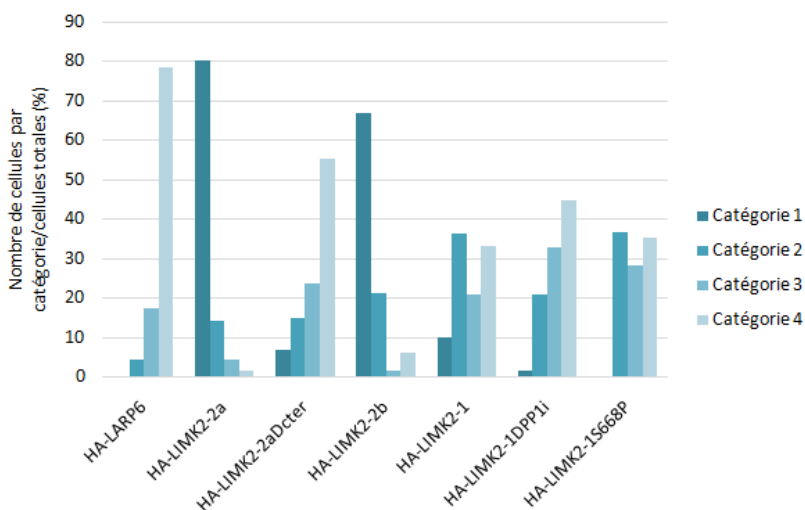


Figure 51 : Représentation graphique des proportions de cellules de chaque catégorie. La proportion de cellules par catégorie est montrée pour chaque condition, c'est-à-dire pour chaque transfection, incluant la transfection d'HA-LIMK2-1S668P. Les catégories représentées correspondent aux cellules présentant des fibres de stress nombreuses et présentes dans plusieurs plans de la cellule (catégorie 1), nombreuses mais présentes sur moins de plans (catégorie 2), éparses (catégories 3) et absentes (catégorie 4).

Nous avons utilisé un test de Fisher pour comparer les profils des fibres de stress pour les cellules transfectées par HA-LIMK2-1S668P par rapport aux cellules transfectées par les autres constructions (Tableau 11). Le profil des fibres de stress des cellules transfectées par HA-LIMK2-1S668P est différent de celui des cellules transfectées par le témoin négatif et par les témoins positifs. Il est aussi différent de celui de cellules surexprimant HA-LIMK2-1. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative entre le profil des cellules transfectées par HA-LIMK2-1 et celui des cellules transfectées par HA-LIMK2-1S668P en prenant en compte une correction pour les tests multiples, mais nos résultats montrent une tendance qui suggère un impact de la mutation sur la formation des fibres de stress.

De manière intéressante, la différence entre le profil des fibres de stress des cellules transfectées par HA-LIMK2-2a Δ Cter et celui des cellules transfectées par HA-LIMK2-1S668P est plus importante que la différence entre les cellules transfectées par HA-LIMK2-1 Δ PP1i et

celles transfectées par HA-LIMK2-1S668P. HA-LIMK2-2aΔCter et HA-LIMK2-1ΔPP1i pourraient donc avoir un rôle différent sur la formation des fibres de stress. La différence entre ces deux constructions est située au niveau de la région N-terminale. En effet, la première possède deux domaines LIM entiers tandis que la seconde possède un domaine LIM tronqué et un domaine LIM entier. C'est cette région qui pourrait être responsable de la différence entre HA-LIMK2-2aΔCter et HA-LIMK2-1ΔPP1i.

Tableau 11 : Comparaison de profils de fibres de stress par rapport à HA-LIMK2-1S668P

Les cellules transfectées par HA-LIMK2-1S668P sont comparées aux cellules transfectées par les autres constructions. Les conditions de transfection ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher suivi d'une correction pour tests multiples. La p value obtenue et la significativité du test sont présentées (* : $p < 2,38E-03$; ** : $p < 9,52E-04$; *** : $p < 4,76E-04$; **** : $p < 4,76E-05$; NS : non significatif).

	HA-LARP6	HA-LIMK2-2a	HA-LIMK2-2aΔCter	HA-LIMK2-2b	HA-LIMK2-1	HA-LIMK2-1ΔPP1i
HA-LIMK2-1S668P	p=8.35E-10 ****	p=3.30E-30 ****	p=2.50E-04 ***	p=5.52E-24 ****	p=1.55E-02 NS	p=0.11 NS

De manière plus générale, ces résultats mettent en évidence, d'une part, un impact de la mutation sur la formation des fibres de stress et suggèrent, d'autre part, un rôle de la région N-terminale de LIMK2, et plus précisément des domaines LIM, sur le profil observé des fibres de stress.

III.2.2. Interaction entre PP1 et le domaine PP1i

Nos résultats précédents suggèrent que PP1 interagit spécifiquement avec une séquence localisée dans le domaine PP1i de LIMK2-1. Nous avons voulu voir si le domaine PP1i interagissait toujours avec PP1 lorsqu'il portait la mutation S668P. Pour cela, nous avons co-transfecté PP1 étiquetée Flag avec le domaine PP1i ou le domaine PP1i muté étiquetés HA (Figure 52).

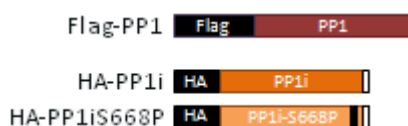


Figure 52 : Constructions utilisées pour l'étude de la variation p.S668P

L'impact de la variation p.S668P a été étudié sur l'interaction avec PP1. L'interaction a été testée entre Flag-PP1 et HA-PP1i ou HA-PP1iS668P.

Nous avons ensuite révélé les lysats et les éluats avec un anticorps anti-Flag et un anticorps anti-HA (Figure 53). Le domaine PP1i de LIMK2-1 interagit moins bien avec PP1 lorsque la mutation S668P est introduite. Cet impact de la mutation pourrait être dû à un changement de conformation du domaine PP1i.

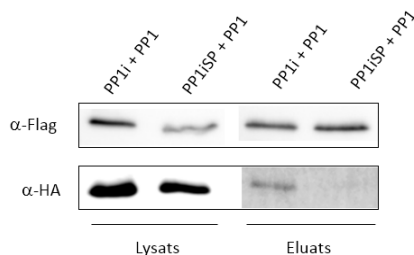


Figure 53 : Interaction entre PP1 et le domaine PP1i porteur de la mutation S668P
Western blot anti-HA et anti-Flag des lysats et des éluats anti-Flag obtenus à partir des co-transfections de Flag-PP1 et HA-PP1i ou HA-PP1iS668P.

III.3. Mise en place d'un modèle de neurodéveloppement humain

Au cours de la thèse précédente (Tastet, 2012), l'impact de la mutation a été étudié sur un modèle cellulaire murin : les NSC-34. Cette analyse a mis en évidence une variation de la longueur des neurites lorsque la protéine mutée est surexprimée, par rapport à une surexpression de la protéine normale (partie IV des résultats). L'isoforme LIMK2-1 étant spécifique des hominidés, nous avons voulu mettre en place un modèle de neurodéveloppement humain afin d'étudier l'impact de la mutation sur des cellules humaines et, le cas échéant, de confirmer les résultats observés lors de l'étude sur les cellules murines.

Nous avons choisi d'utiliser des SH-SY5Y, qui sont des cellules de neuroblastomes humains constituant un modèle pour étudier les phases initiales de la différenciation neuronale (de Bittencourt Pasquali et al., 2014). Nous avons exposé les cellules à l'acide rétinoïque puis nous les avons observées au microscope optique avant la différenciation, 3 jours et 6 jours après le début de la différenciation afin d'évaluer les modifications morphologiques. Nous avons également extrait les ARN à J0, à J3 et à J6 pour mesurer l'expression de la protéine GAP43, un marqueur de la différenciation neuronale (Shiohira et al., 2012).

Au cours de la différenciation, nous pouvons observer une modification du nombre et de la morphologie des cellules qui deviennent moins nombreuses, plus allongées, et développent des neurites (Figure 54). La quantification de l'ARNm de GAP43 montre une légère augmentation au cours de la différenciation (Figure 55).

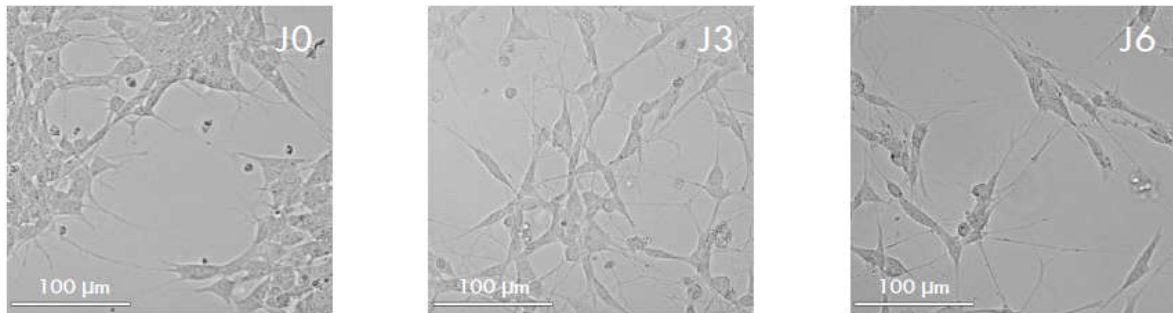


Figure 54 : Observation des SH-SY5Y au microscope optique
Les cellules ont été observées au microscope optique à J0, à J3 et à J6. Echelle : 10 µm.

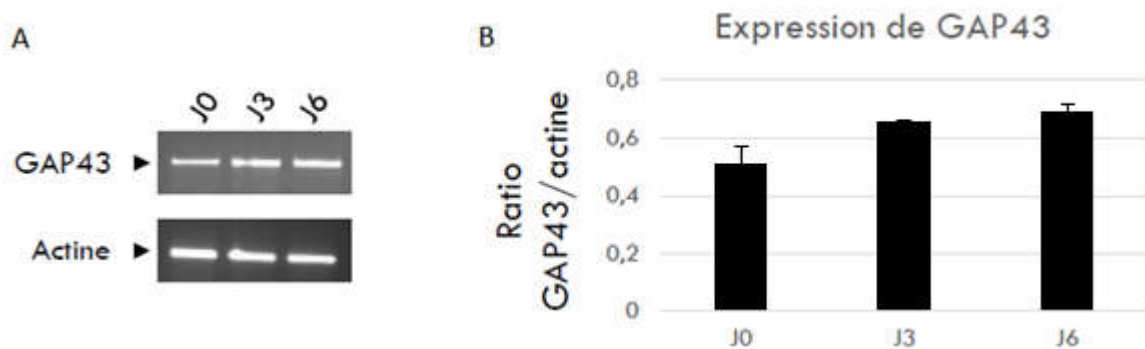


Figure 55 : Expression du marqueur de différenciation neuronale GAP43
(A) Expression de l'ARNm de GAP43 et de l'actine à J0, à J3 et à J6. (B) Quantification du taux d'ARNm de GAP43 normalisé par rapport à l'actine. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SEM.

Nous avons donc pu différencier les cellules SH-SY5Y. Toutefois, la mise en place du modèle de neurodéveloppement nécessite également l'optimisation de la transfection des SH-SY5Y. Ce travail n'est pas abouti à ce jour et fait partie des perspectives immédiates de ce travail.

IV. Article soumis dans Neuroscience

Les résultats issus de la thèse précédente (Tastet, 2012) et portant sur LIMK2-1 ont fait l'objet d'un article, auquel ont été ajoutés les résultats portant sur l'expression de LIMK2-1 (partie I des résultats) et les nouvelles données concernant l'apparition de LIMK2-1 au cours de l'évolution (partie III des résultats). Cet article, intitulé « LIMK2-1 is hominidae-specific isoform of LIMK2 expressed in central nervous system and associated with intellectual disability » sera soumis dans Neuroscience et est présenté ci-après.

LIMK2-1 is a hominidae-specific isoform of LIMK2 expressed in central nervous system and associated with intellectual disability

Julie Tastet^{a,b,#}, Hélène Cuberos^{a,b,#}, Annick Toutain^{a,c,d}, Martine Raynaud^{a,c}, Sylviane Marouillat^a, Rose-Anne Thépault^a, Frédéric Laumonier^a, Frédérique Bonnet-Brilhault^{a,d}, Béatrice Vallée^b, Patrick Vourc'h^{a,e}, Christian R. Andres^{a,e}, Hélène Bénédicti^b

^aUMR INSERM U930, Université François Rabelais, Tours, France

^bCNRS UPR 4301, CBM, Orléans, France

^cCHRU de Tours, Service de Génétique, Tours, France

^dCHRU de Tours, Service de Pédiopsychiatrie, Tours, France

^eCHRU de Tours, Service de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Tours, France

[#]These authors contributed equally to this work

Abstract

LIMK1 and LIMK2 are involved in neuronal function by regulating actin dynamics. Different isoforms of LIMK2 are described in databanks and some of them, LIMK2-2a, 2b and 2d have been characterized. A few pieces of evidence suggest that LIMK2 isoforms might not have overlapping functions. In this study, we focused our attention on a human LIMK2 isoform, LIMK2-1.

Compared to the other LIMK2 isoforms, LIMK2-1 contains a supplementary phosphatase 1 inhibitory domain (PP1i). We found out this isoform is primate-specific (Hominidae) and showed it is expressed in human fetal and adult brain. Its coding sequence was sequenced in 173 patients with sporadic non-syndromic intellectual disability (ID), and we could associate a rare missense mutation in the PP1i domain (rs151191437, p.S668P) with ID. We also showed that LIMK2-1 was shown to play a role in neurite outgrowth and the p.S668P variation appeared to disturb this impact. Therefore our results demonstrate that LIMK2-1 is a new functional isoform of LIMK2 playing a role in the brain, and that a rare variation of this isoform is a susceptibility factor in ID.

1. Introduction

LIMK family comprises two members: LIMK1 and LIMK2. These two proteins share 50 % identity. They are Ser/Thr kinases involved in cytoskeleton remodelling. They phosphorylate and

subsequently inactivate cofilin, an actin depolymerising factor (Arber et al., 1998c). Their role on actin dynamics through their regulation of the balance between phospho-cofilin and cofilin has been widely described (Aizawa et al., 2001; Endo et al., 2007; Hsieh et al., 2006). They also regulate microtubule stability (Gorovoy et al., 2005), and play a role in mitotic spindle integrity (Heng et al., 2012; Po'uha et al., 2010). They are involved in cancer development and metastasis propagation (Manetti, 2012; Scott and Olson, 2007). They also play a role in neuronal functions, particularly in neurite outgrowth and synaptic plasticity, and in several neuronal diseases (Cuberos et al., 2015). Recent studies suggest a role for LIMKs independently of cofilin phosphorylation, especially in neuronal functions. Other substrates of LIMK1 have been identified in the central nervous system (CNS) (Sacchetti et al., 2006; Yang et al., 2004a). One of them, CREB, is involved in long-term late-phase potentiation (L-LTP) and long term memory (Todorovski et al., 2015). Furthermore, LIMKs seem to exert functions independently of their kinase activity since overexpression of the N-terminal non-catalytic region of LIMK1 in PC12 cells has been shown to inhibit neurite outgrowth (Birkenfeld et al., 2001) whereas overexpression of LIMK2d (a LIMK2 isoform lacking the kinase domain) in NSC-34 cells led to a significant increase in neurite length (Tastet et al., 2012).

Several pieces of evidence suggest that LIMK1 and LIMK2 most probably play distinct roles particularly in the CNS. Indeed, deletion of *LIMK1* or *LIMK2* results in relatively mild but different phenotypes in mice (Meng et al., 2002, 2004), they are differently regulated by Rho family GTPases (Edwards et al., 1999; Sumi et al., 2001a, 2001b) and they have different subcellular localizations and activities during the different stages of the cell cycle (Acevedo et al., 2006; Foletta et al., 2004; Sumi et al., 2006). Different isoforms of LIMK2 are described in the databanks and some of them (LIMK2-2a, 2b, 2d) have been characterized. However, most of the studies on LIMK2 do not precise which isoform is under investigation. Different arguments indicate that they might display functional differences. For example, LIMK2-2a and LIMK2-2b exhibit different tissue distribution and are differently expressed during development stages (Osada et al. 1996, Nomoto et al. 1999). Furthermore, their cellular localization and stability differs (Gamell et al., 2013; Osada et al., 1996). In addition, LIMK2-2b as well as LIMK2-1, but not LIMK2-2a, are targets of p53 (Croft et al., 2011).

The present study focuses on LIMK2-1, a human LIMK2 isoform poorly studied. So far, only one paper refers to LIMK2-1 existence at an mRNA level (Croft et al. 2011). Compared to the other isoforms, LIMK2-1 lacks a few amino acids in its kinase domain and contains a

supplementary phosphatase 1 inhibitory domain (PP1i) at its C-terminal extremity. By *in silico* analysis, we showed that this isoform is specific to hominidae primates. We demonstrated that LIMK2-1 is expressed in human fetal and adult brain, both at mRNA and protein level. These observations, together with the known involvement of LIM kinases in neurodevelopment, prompted us to further study this particular isoform in cognitive disorders. We found out an association between a rare mutation in the PP1i domain of LIMK2-1 and non-syndromic intellectual disability (ID). On a functional level, we demonstrated that LIMK2-1 has a distinct effect on neurite outgrowth compared to LIMK2-2b, and that the mutation associated with ID disturbs this effect.

2. Materials and methods

2.1 Subjects

Patients with non-syndromic ID were examined in the Child Psychiatry Unit and the Clinical genetics Unit of the University Hospital of Tours (France) (n=173). Recognizable genetic diseases have been excluded by clinicians and cytogeneticists. All patients tested were negative for fragile X mutation. A practitioner from the Center of Clinical Investigations in Tours examined control individuals. These control individuals and their family did not present any psychiatric or developmental diseases. Written consents were obtained from patients (or parents) and from control individuals.

2.2 Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using standard procedures. The sequence coding the PP1i domain was analyzed by sequencing. PCR were done in a final volume of 50 μ L containing 10 pmol of each primer, 125 nmol MgCl₂, 10 nmol dNTP, 50 ng DNA, 1X GoTaq flexi buffer and 1.25U GoTaq polymerase (Promega, Madison, USA). Reactions were performed at 95°C 1 min, 60°C 30 sec, 72°C 1 min for 35 cycles. Sequencing reactions were done in a volume of 10 μ L containing 20 pmol of either forward or reverse primer (Table S1), 2 μ L of PCR products, 1X buffer and 1 μ L of BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Cheshire, UK). Reactions were performed at 96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4 min for 25 cycles. Products were purified on Millipore Montage SEQ96 plates before bidirectional sequencing in an ABI 3130xl sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France; analysis with CodonCode Aligner Software). Genotype frequencies were compared using a Fisher exact test (BiostaTGV server, <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>).

2.3 Comparison of sequences, 2D structures and 3D modeling

The presence of a PP1i-coding sequence in LIMK2 isoform of a variety of species among evolution was studied using blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). 2D structure comparison and 3D modeling of the PP1i domain of LIMK2-1 was done first by searching the Brookhaven Protein Data Bank for the most similar protein(s) to this domain. Among the crystallized proteins, PKC-potentiated inhibitory protein of PP1, CPI-17 chain A, showed the highest sequence identity with the PP1i of LIMK2-1 (38%). Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B (PHI-1, PPP1R14B) presented a higher percentage of identity but its 3D structure is not known. 2D structure comparison of the PP1i domain of LIMK2-1 and CPI-17 was done using the ESPRIT software and PDB data (#1J2M). We used the coordinates of CPI-17 structure in the Swiss-model workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>; default parameters) to model the wild type and mutant forms of the PP1i domain of LIMK2-1. Ribbon representations of the wild type and mutant forms were obtained using the molecular graphics tool PyMOL v1.3.

2.4 Cell culture

HEK-293 cells (85120602, European Collection of Cell cultures, Salisbury, UK) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 1g/L glucose (Sigma-Aldrich) supplemented with 10 % fetal calf serum. Neuronal cell line NSC-34 (CLU140-A, Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) was cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose, 0.58 g/L L-glutamine and 10 % fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

2.5 PCR

LIMK2-1 specific cDNA region (exons 15 to 16-1) (figure 1A) and *GAPDH* were amplified using GoTaqR Flexi DNA Polymerase (Promega) in a 25 µL reaction mixture containing 1 µL of human fetal brain, adult cortex, hippocampus and cerebellum cDNA (BioChainR, Newark, CA) according to the supplier's instructions. Primer sequences are in table S1. Amplification consisted in 35 cycles of 94°C 10 sec, 60°C 30 sec and 72°C 30 sec.

2.6 Transfection

Plasmids used in this study are listed in Table 1. HEK-293 cells were transfected with 10 µg of plasmid/10-mm dish with Calcium Phosphate method. NSC-34 cells (30 % confluence) were transfected with Lipofectamine 2000 according to manufacturer's instructions (Invitrogen™) one

hour after plating. Medium was replaced with DMEM without serum 4 hours after transfection. Neurite outgrowth was induced by this serum starvation during 36 hours.

2.7 Protein extraction and Western blotting

Total proteins from HEK-293 and NSC-34 cells were extracted using a lysis buffer containing 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 10 µg/ml aprotinin, 10 mM pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM para-nitrophenylphosphate, 1 µg/ml leupeptin, 50 ng/ml okadaic acid, 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride and 20 mM β-glycerophosphate. 15 to 20 µg of total proteins and proteins from human fetal brain, adult cortex, hippocampus and cerebellum (BioChainR, Newark, CA) were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane. Membrane was first incubated within 5 % milk in Tris buffer saline, 0.1 % Tween-20. Membrane was then incubated with rabbit anti-PP1i antibody developed for us by Eurogentec (1/2000) overnight at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat antibody (656120, Invitrogen™, 1/33000) was used as secondary antibody before chemiluminescence analysis using the SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

2.8 Immunofluorescence and assessment of neurite length

The neurite length was assessed after immunofluorescence staining. Cell medium was removed and the cells were washed with cold Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen™). Cells were then fixed with 4 % paraformaldehyde (Sigma-AldrichR) in PBS for 30 min. After washing step with cold PBS, cells were incubated with 2 % bovine serum albumin and 0.3 % Triton X-100 in PBS for 1 hour. After additional washing step, cells were incubated overnight at 4°C with a rat monoclonal primary antibody against HA (11-867-423-001, 1/100, Roche) and 2 hours with Cy3-conjugated donkey antibody against rat IgG (712-165-150, 1/200, Zymed-Invitrogen™). Preparations were mounted with Prolong Gold Antifade (Invitrogen™) and observed under Olympus Fluoview 500 confocal laser scanning microscope. Lengths of the longest neurite of NSC-34 cells expressing HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1 or HA-LIMK2-1S668P were measured as previously described (Tastet et al., 2012). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney non-parametric test (StatPlusR:mac software, version 5.8.3.8. 2001-2009 Analyst Soft Inc.). Significance was defined as $p < 0.05$ (NS, non-significant ; * $p < 0.05$).

3. Results

3.1 LIMK2-1 is an hominidae primate-specific isoform

In the protein databanks (NCBI, Uniprot and Ensembl), three human isoforms of LIMK2 are described: LIMK2-2a, LIMK2-2b and LIMK2-1. They differ only at their extremities. Isoforms 2b and 1 have a truncated first LIM domain compared to LIMK2-2a and isoform 1 lacks a few amino acids at the end of the kinase domain and possesses an extra C-terminal domain compared to LIMK2-2a and 2b (figure 1B). This C-terminal part is predicted to be a phosphatase 1 inhibitory domain (PP1i) based on its high identity (93%) with the phosphatase 1 inhibitor protein PHI-1 (PPP1R14B) (Pfam E value: 1.1×10^{-30} and superfamily E value: 4.18×10^{-32}).

In order to determine whether *LIMK2-1* was expressed in other species, *in silico* analyses were performed in NCBI and Ensembl databases. LIMK2-1 was only found in hominidae primates. Using blastp, we did not find such a sequence encoding a PP1i domain in proximity (30 kb) of the last *Limk2* exon in rodents (*i.e.* rat).

3.2 LIMK2-1 is expressed in the human central nervous system

LIMK2-2a and, in a lesser extent, LIMK2-2b have already been characterized and studied. Although LIMK2-1 was described in Protein DataBank long ago, it has only been recently reported at the mRNA level in the Saos-2 cell line (Croft et al., 2011). To further characterize this isoform, we first analyzed its expression by PCR in human cDNA samples. As shown in Figure 1, *LIMK2-1* mRNA is expressed in fetal brain as well as in adult hippocampus, cortex and cerebellum. Using an antibody directed against a peptide of the specific C-terminal domain of LIMK2-1 (figure 3A), we demonstrated for the first time that LIMK2-1 is expressed at a protein level in HEK-293 and that it is absent from NSC-34, a non-primate cell line (figure 3B). Furthermore, we showed the expression of LIMK2-1 at a protein level in human fetal brain and adult cortex (figure 3C).

3.3 *LIMK2-1* contains a rare missense mutation in the PP1i encoding region

In order to get insights into LIMK2-1 brain function, we analyzed the coding sequence of the PP1i region in patients with ID. One rare mutation, rs151191437 (c.2232T>C, p.S668P), was identified. Genotype frequency of this mutation was significantly associated with ID (Yates' Chi-square; $p=0.03$, odds ratio=3.7, IC 95%: [1.3-10.8]). This variation causes the substitution of serine 668 into a proline (S668P) in the PP1i domain of LIMK2-1. This variation was absent in 206 French control individuals from our Center (comparison at allele level: $p = 0.026$ two sided Fisher

exact test; comparison of genotypes, dominant model: $p = 0.04$ two sided Fisher exact test) (Table 2). The thymine 2232 was conserved during evolution in hominidae primates suggesting a potential important role for this nucleotide (Figure 4A). This is further supported by the fact that the serine 668 is also conserved in the PP1i domain of PHI-1 in several species during a long evolutionary period (Figure 4B). Submission of LIMK2-1 sequence to PolyPhen2 program (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) predicted that the mutation had a high probability of damaging protein function with a score of 0.956/1 (sensitivity 0.79, specificity 0.95). We next modeled the 3D structure of the PP1i domain of LIMK2-1 using PKC-potentiated inhibitory protein of PP1, CPI-17 as a template (PDB ID: 1J2M chain A) (model: E value 1.10⁻³⁹, QMEAN Z-Score -4.78) (Figure 4C, D). When the mutation p.S668P was introduced, the model predicted a change in the shape of the first turn of the helix $\alpha 4$ (Figure 4D), which corresponds to classical proline properties. Altogether, these data support the idea that the rare mutation c.2232T>C in the PP1i domain of LIMK2-1 could constitute a risk factor in ID.

3.4 The impact of LIMK2-1 on neurite outgrowth is disturbed by the p.S668P mutation

The inhibition of LIMK2-2a, 2b and 2c expression by a siRNA targeting a region of the mRNA encoding the PDZ domain decreased neurite outgrowth in rat PC12 cells thereby indicating that these isoforms stimulate the growth of neurites (Endo et al., 2007). To assess if the hominidae primate-specific isoform LIMK2-1 might play a role in neurite extension, the neuronal NSC-34 cell line was transfected with plasmids encoding HA-tagged LIMK2-1 or LIMK2-2b (as a positive control), and neurite extension was compared. The expression of the proteins was confirmed by immunocytochemistry and their presence was detected in the soma and neurites (Figure 5A). The length of the longest neurites was measured in transfected cells. HA-LIMK2-1 expressing cells displayed smaller neurites compared to those expressing HA-LIMK2-2b ($p < 0.05$, Figure 5B). To determine the effect of p.S668P mutation on LIMK2-1 function, NSC-34 cells were transfected with a plasmid encoding LIMK2-1 S668P, and neurite outgrowth was assessed as previously (Figure 5A). The presence of the p.S668P mutation increased the length of neurites compared to LIMK2-1 ($p < 0.05$, Figure 5B). The length of the longest neurite was similar in cells overexpressing LIMK2-1 S668P and LIMK2-2b.

4. Discussion

In this study, we focused our attention on a particular human isoform of LIMK2, LIMK2-1. Unlike LIMK2-2a and LIMK2-2b, which are found in many species, we showed that LIMK2-1 is a

hominidae primate-specific isoform. LIMK2-2b and LIMK2-1 differ from LIMK2-2a at their N-terminal domain while LIMK2-1 differs from LIMK2-2a and LIMK2-2b by a truncated kinase domain and an extra PP1i domain at its C-terminal extremity. To date, the impact of the deletion of a few amino acids of the kinase domain and the activity of the PP1i domain are unknown. However, PP1i domain sequence is highly similar (93% identity) to the one of PHI-1 protein for which the inhibitory activity on PP1 is clearly established (Eto et al., 1999). Protein phosphatase 1 (PP1) has been involved in both neurite outgrowth (Han et al., 2007; Li et al., 2007; Monroe and Heathcote, 2013) and synaptic plasticity (Hu et al., 2007; Morishita et al., 2001; Munton et al., 2004; Siddoway et al., 2013). We can then reasonably assume that PP1 regulation is of crucial importance in these mechanisms and hypothesize that LIMK2-1, via its PP1i domain, might play a role in PP1 regulation.

To date, nothing is known about the function of LIMK2-1. Its expression as a transcript has only been shown in human osteosarcoma Saos-2 cell line (Croft et al., 2011). In this work, we demonstrated its expression as a transcript in human fetal brain and in human adult cortex, hippocampus and cerebellum, which are involved in cognition processes. Moreover, we showed for the first time its expression as a protein in human fetal brain and in human adult cortex. Its expression is much lower in cerebellum and absent from the hippocampus. Nevertheless, it is important to note that this expression pattern could be age-dependent. Indeed, our cortex and cerebellum samples came from young people whereas our hippocampus sample came from an 82-years-old woman. However, LIMK2-1 expression in the central nervous system strengthens the interest to investigate its role in cognitive functions.

We therefore searched for the existence of variations in *LIMK2-1* in a population of patients with intellectual disability (ID). ID is a complex cognitive disorder characterized by below average intellectual functioning (IQ<70). Etiologies of ID are highly heterogeneous, including environmental factor and genetic defects that affect development and functioning of the nervous system (Srivastava and Schwartz, 2014). We showed that the variation rs151191437 is significantly higher in the population with ID, compared to controls. This missense mutation is located in the PP1i domain of LIMK2-1. The absence of the mutation in our control population indicates that it is a rare mutation in our ethno-geographic population. This fact is confirmed by the exome variant server database where the frequency is 0.63 %. The presence of the variation in the general population may be explained by a polygenic susceptibility model or by the presence of a lower range IQ population in this group. Considered as probably damaging by the PolyPhen2 program,

this variation could affect the function of LIMK2-1. Moreover, serine 668 is highly conserved in the PP1i domain of LIMK2-1 in hominidae primates and its substitution by proline is predicted to disrupt one α -helical turn in the PP1i domain.

Numerous genes with variation associated with ID regulate neurite outgrowth (Doers et al., 2014; Jolly et al., 2013; Ramakers, 2002; Van Maldergem et al., 2013). We therefore assessed the role of LIMK2-1 in this cellular process. Previous studies demonstrated that LIMK2-2a, 2b and 2c are involved in neurite outgrowth (Endo et al., 2007). We showed that NSC-34 cells overexpressing HA-LIMK2-1 displayed significantly smaller neurites compared with NSC-34 cells overexpressing LIMK2-2b. Thus, LIMK2-1 does not function the same way as LIMK2-2b on neurite outgrowth, although we cannot conclude on the molecular mechanisms involved. Since LIMK2-1 and LIMK2-2b only differ by their C-terminal region including the last amino acids of the kinase domain and the PP1i domain, we can assume a role of this extra C-terminal region in the control of neurite outgrowth. Furthermore, we showed that cells overexpressing HA-LIMK2-1 S668P displayed longer neurites than cells expressing HA-LIMK2-1, suggesting more precisely that the PP1i domain is involved in LIMK2-1 function on neurite outgrowth and that the p.S668P variation disturbs this function.

In conclusion, we report for the first time that the primate-specific isoform LIMK2-1 is expressed in the central nervous system during neurodevelopment and in adult. We also report a variation in the PP1i domain associated with ID. A replication of this association needs to be obtained in independent ID populations to confirm the involvement of the p.S668P variation in ID. Our findings highlight the necessity to assess the implication of LIMK2 in ID etiology and confirm the importance of primate-specific proteins in cognitive disorders (Drews et al., 2013; Huffaker et al., 2009). Finally, we suggested a role for LIMK2-1 in neurite outgrowth through its PP1i domain. Further investigations are required to define the molecular mechanisms involved and the precise role of this isoform in brain functions.

Conflict of interest

None to declare.

Acknowledgments

This work was supported by the Région Centre, Ligue contre le Cancer, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université François-Rabelais de Tours, and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank the Département Génomique of the Plateforme Pluri-Formation Analyses Systèmes Biologiques (Université François-Rabelais de Tours).

References

- Acevedo, K., Moussi, N., Li, R., Soo, P., Bernard, O., 2006. LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 54, 487–501. doi:10.1369/jhc.5C6813.2006
- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., Yahara, I., 2001. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat. Neurosci.* 4, 367–373. doi:10.1038/86011
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., Caroni, P., 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805–809. doi:10.1038/31729
- Birkenfeld, J., Betz, H., Roth, D., 2001. Inhibition of neurite extension by overexpression of individual domains of LIM kinase 1. *J. Neurochem.* 78, 924–927.
- 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., Olson, M.F., 2011. p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res.* 21, 666–682. doi:10.1038/cr.2010.154
- Cuberos, H., Vallée, B., Vouret-Craviat, P., Tastet, J., Andres, C.R., Bénédicti, H., 2015. Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction. *FEBS Lett.* 589, 3795–3806. doi:10.1016/j.febslet.2015.10.032
- Doers, M., Musser, M., Nichol, R., Berndt, E., Baker, M., Gomez, T., Zhang, S., Abbeduto, L., Bhattacharyya, A., 2014. iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem Cells Dev* 23, 1777–1787.
- Drews, E., Otte, D.-M., Zimmer, A., 2013. Involvement of the primate specific gene G72 in schizophrenia: From genetic studies to pathomechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 2410–2417. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.10.009
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N., 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1, 253–259. doi:10.1038/12963

- Endo, M., Ohashi, K., Mizuno, K., 2007. LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *J. Biol. Chem.* 282, 13692–13702. doi:10.1074/jbc.M610873200
- Eto, M., Karginov, A., Brautigan, D.L., 1999. A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 16952–16957.
- Foletta, V.C., Moussi, N., Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R., Bernard, O., 2004. LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp. Cell Res.* 294, 392–405. doi:10.1016/j.yexcr.2003.11.024
- Gamell, C., Schofield, A.V., Suryadinata, R., Sarcevic, B., Bernard, O., 2013. LIMK2 mediates resistance to chemotherapeutic drugs in neuroblastoma cells through regulation of drug-induced cell cycle arrest. *PloS One* 8, e72850. doi:10.1371/journal.pone.0072850
- Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R., Voyno-Yasenetskaya, T., 2005. LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 26533–26542. doi:10.1074/jbc.M502921200
- Han, J., Han, L., Tiwari, P., Wen, Z., Zheng, J.Q., 2007. Spatial targeting of type II protein kinase A to filopodia mediates the regulation of growth cone guidance by cAMP. *J. Cell Biol.* 176, 101–111. doi:10.1083/jcb.200607128
- Heng, Y.-W., Lim, H.-H., Mina, T., Utomo, P., Zhong, S., Lim, C.-T., Koh, C.-G., 2012. TPPP acts downstream of RhoA-ROCK-LIMK2 to regulate astral microtubule organization and spindle orientation. *J. Cell Sci.* 125, 1579–1590. doi:10.1242/jcs.096818
- Hsieh, S.H.-K., Ferraro, G.B., Fournier, A.E., 2006. Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1006–1015. doi:10.1523/JNEUROSCI.2806-05.2006
- Huffaker, S.J., Chen, J., Nicodemus, K.K., Sambataro, F., Yang, F., Mattay, V., Lipska, B.K., Hyde, T.M., Song, J., Rujescu, D., Giegling, I., Mayilyan, K., Proust, M.J., Soghoyan, A., Caforio, G., Callicott, J.H., Bertolino, A., Meyer-Lindenberg, A., Chang, J., Ji, Y., Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kleinman, J.E., Lu, B., Weinberger, D.R., 2009. A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia. *Nat. Med.* 15, 509–518. doi:10.1038/nm.1962
- Hu, X., Huang, Q., Yang, X., Xia, H., 2007. Differential regulation of AMPA receptor trafficking by neurabin-targeted synaptic protein phosphatase-1 in synaptic transmission and long-term depression in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 4674–4686. doi:10.1523/JNEUROSCI.5365-06.2007
- Jolly, L.A., Homan, C.C., Jacob, R., Barry, S., Gecz, J., 2013. The UPF3B gene, implicated in intellectual disability, autism, ADHD and childhood onset schizophrenia regulates neural progenitor cell behaviour and neuronal outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4673–4687. doi:10.1093/hmg/ddt315
- Li, T., Chalifour, L.E., Paudel, H.K., 2007. Phosphorylation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent protein kinase 5 during nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 282, 6619–6628. doi:10.1074/jbc.M606347200

- Manetti, F., 2012. LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med. Res. Rev.* 32, 968–998. doi:10.1002/med.20230
- Meng, Y., Takahashi, H., Meng, J., Zhang, Y., Lu, G., Asrar, S., Nakamura, T., Jia, Z., 2004. Regulation of ADF/cofilin phosphorylation and synaptic function by LIM-kinase. *Neuropharmacology* 47, 746–754. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.030
- Monroe, J.D., Heathcote, R.D., 2013. Protein phosphatases regulate the growth of developing neurites. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 31, 250–257. doi:10.1016/j.ijdevneu.2013.01.005
- Morishita, W., Connor, J.H., Xia, H., Quinlan, E.M., Shenolikar, S., Malenka, R.C., 2001. Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron* 32, 1133–1148.
- Munton, R.P., Vizi, S., Mansuy, I.M., 2004. The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett.* 567, 121–128. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.121
- Osada, H., Hasada, K., Inazawa, J., Uchida, K., Ueda, R., Takahashi, T., Takahashi, T., 1996. Subcellular localization and protein interaction of the human LIMK2 gene expressing alternative transcripts with tissue-specific regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 582–589. doi:10.1006/bbrc.1996.1847
- Po'uha, S.T., Shum, M.S.Y., Goebel, A., Bernard, O., Kavallaris, M., 2010. LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* 29, 597–607. doi:10.1038/onc.2009.367
- Ramakers, G.J.A., 2002. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci.* 25, 191–199.
- Sacchetti, P., Carpentier, R., Ségard, P., Olivé-Cren, C., Lefebvre, P., 2006. Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res.* 34, 5515–5527. doi:10.1093/nar/gkl712
- Scott, R.W., Olson, M.F., 2007. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 85, 555–568. doi:10.1007/s00109-007-0165-6
- Siddoway, B.A., Altimimi, H.F., Hou, H., Petralia, R.S., Xu, B., Stellwagen, D., Xia, H., 2013. An essential role for inhibitor-2 regulation of protein phosphatase-1 in synaptic scaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 11206–11211. doi:10.1523/JNEUROSCI.5241-12.2013
- Srivastava, A.K., Schwartz, C.E., 2014. Intellectual disability and autism spectrum disorders: causal genes and molecular mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 46 Pt 2, 161–174. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.02.015
- Sumi, T., Hashigasako, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., 2006. Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition. *Exp. Cell Res.* 312, 1021–1030. doi:10.1016/j.yexcr.2005.12.030

- Sumi, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., 2001a. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 670–676. doi:10.1074/jbc.M007074200
- Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A., Nakamura, T., 2001b. Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J. Biol. Chem.* 276, 23092–23096. doi:10.1074/jbc.C100196200
- Tastet, J., Vourc'h, P., Laumonier, F., Vallée, B., Michelle, C., Duittoz, A., Bénédicti, H., Andres, C.R., 2012. LIMK2d, a truncated isoform of Lim kinase 2 regulates neurite growth in absence of the LIM kinase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 247–252. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.134
- Todorovski, Z., Asrar, S., Liu, J., Saw, N.M.N., Joshi, K., Cortez, M.A., Snead, O.C., Xie, W., Jia, Z., 2015. LIMK1 regulates long-term memory and synaptic plasticity via the transcriptional factor CREB. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/MCB.01263-14
- Van Maldergem, L., Hou, Q., Kalscheuer, V., Rio, M., Doco-Fenzy, M., Medeira, A., de Brouwer, A., Cabrol, C., Haas, S., Cacciagli, P., Moutton, S., Landais, E., Motte, J., Colleaux, L., Bonnet, C., Villard, L., Dupont, J., Man, H., 2013. Loss of function of KIAA2022 causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth. *Hum Mol Genet* 22, 3306–3314. doi:10.1093/hmg/ddt187
- Yang, E.J., Yoon, J.-H., Min, D.S., Chung, K.C., 2004. LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 279, 8903–8910. doi:10.1074/jbc.M311913200

Figure legends

Figure 1: Schematic diagram of LIMK2-1 pre-mRNA (A) and protein (B)

Figure 2: Expression of LIMK2-1 cDNA in the central nervous system

RT-PCR products of LIMK2-1 and GAPDH in human fetal brain and adult cortex, hippocampus and cerebellum.

Figure 3: Expression of LIMK2-1 protein in the central nervous system

Sequences of the kinase and PP1i domains of LIMK2-2a, 2b and -1. The peptide used to develop anti-PP1i antibodies is indicated (A). Validation of the anti-PP1i antibody using HEK-293 cells expressing native LIMK2-1 or overexpressing HA-LIMK2-1 or HA-LIMK2-2b. NSC-34 cells constitute a negative control and * indicates a background band (B), Analyses of human fetal brain and adult cortex, hippocampus and cerebellum by western-blot using the anti-PP1i antibody(C).

Figure 4: Conservation and 3D structure model of the PP1i domain of LIMK2-1

Alignments of genomic sequences of the regions coding the serine 668 of the PP1i domain of LIMK2-1 in 4 primates: *Homo sapiens* (NM_001031801.1), *Pan troglodytes* (NC_006489.3), *Gorilla gorilla* (NC_018446.1) and *Pongo abelii* (NW_002891525.1) (A). Alignment of primary sequences of the PP1i domain of LIMK2-1 in *Homo sapiens* (P53671-3) with sequences of the PP1i domain of the phosphatase inhibitor 1 (PHI-1) of several species: *Homo sapiens* (Q96C90), *Pan troglodytes* (K7BGM2), *Callithrix jacchus* (F6Q451), *Macacamulata* (H9YV07), *Canis lupus* (F1PCV4), *Feliscatus* (M3WW18), *Rattusnorvegicus* (Q8K3F3), *Mus musculus* (Q62084), *Equuscaballus* (F6Q2M3), *Susscrofa* (Q8MIK9), *Ailuropodamelanoleuca* (G1MI51) and *Xenopustropicalis* (F7C4E8)(B). Alignment of primary and secondary structures of the PP1i domain of human LIMK2-1 with the PP1i domain of human CPI-17 using the ESPRIT software (C). Model structures of the PP1i domain of LIMK2-1 (left panel) and LIMK2-1S668P (right panel) (D).

Figure 5: Role of LIMK2-1 on neurite length in NSC-34 transfected cells

Immunocytochemistry with anti-HA antibody on NSC-34 cells expressing HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1 or HA-LIMK2-1-S668P. Scale bar: 20 μ m (A). Effect of HA-LIMK2-2b, HA-LIMK2-1 or HA-LIMK2-1-S668P expression on neurite length of NSC-34 cells. Data are means \pm SEM of three independent experiments (* $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) (B).

Tables

Table 1: List of plasmids used in this study.

Table 2: Genotype frequencies of variations in the coding sequence of the PP1i domain of *LIMK2-1* in French patients with ID. Database: Exome Variant Server.

Supporting information

Table S1: Primer sequences used for sequencing and PCR

Figure 1

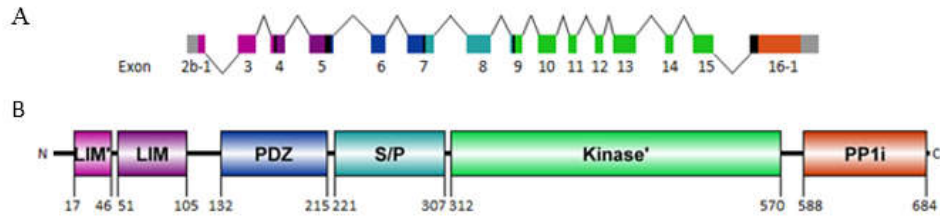


Figure 2

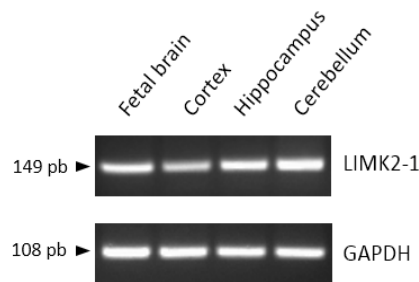


Figure 3

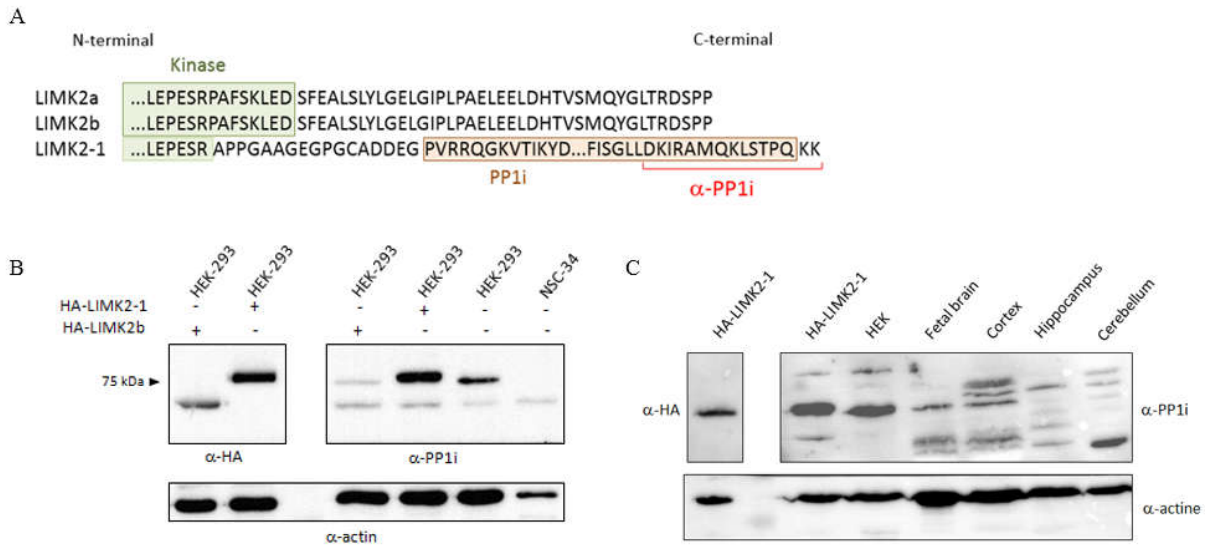


Figure 5

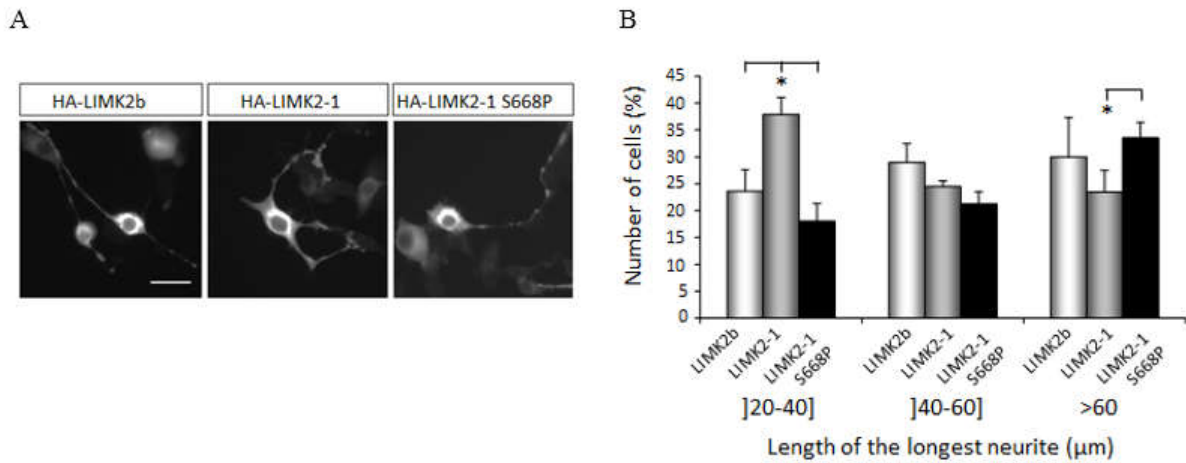


Table 1

Plasmid	Description	Source
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-2b	P _{CMV} -(HA) ₂ -LIMK2-2b	H. Bénédetti
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-1	P _{CMV} -(HA) ₂ -LIMK2-1	H. Bénédetti
pcDNA3-(HA) ₂ -LIMK2-1S668P	P _{CMV} -(HA) ₂ -LIMK2-1S668P	H. Bénédetti

Table 2

dbSNP	AA change	Domain	Genotype	Distribution of genotypes, n (%)		
				Patients with ID	Our controls	Controls in database
rs151191437	p.S668P	PP1i domain	T/T	169 (97.7)	206 (100)	4273 (99.37)
			C/T	4 (2.3)	0 (0)	27 (0.63)
			C/C	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table S1

Gene	Location	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplified fragment (bp)
<i>LIMK2-1</i>	Exon 16-1	CCAAGGACCACGCATCTACT	CGGTATTGCTGTTGCTACGA	453
	Exons 15 to 16-1	ATGACAGGGCCTTTTATG	GGGAGTTACTTGTCCAGTCCC	149
<i>GAPDH</i>	Exons 7 to 8	CTGCACCACCAACTGCTTAG	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	108

Discussion

La neurofibromatose de type 1 est caractérisée par un tableau clinique complexe, dont les symptômes les plus invalidants sont l'apparition de tumeurs, pouvant dégénérer en cancers, et les troubles cognitifs. Le gène dont les mutations sont à l'origine de la pathologie code la neurofibromine (NF1). Cette protéine, longue de 2818 acides aminés, interagit avec un grand nombre d'autres protéines, régulant ainsi de nombreuses voies cellulaires et moléculaires. Plusieurs de ces voies sont impliquées dans le développement et le fonctionnement du système nerveux central (Figure 56).

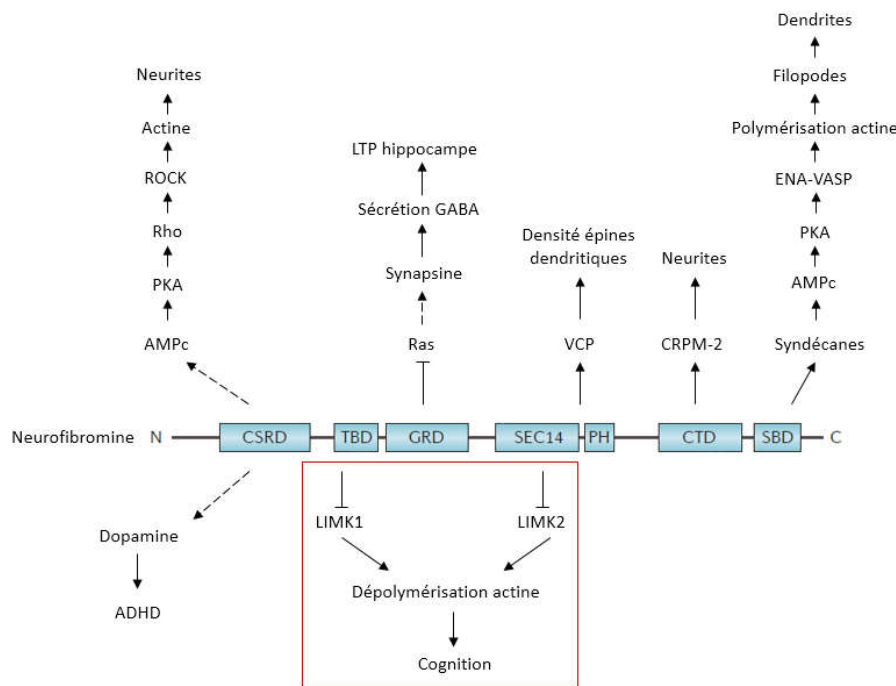


Figure 56 : Voies régulées par NF1 et impliquées dans le système nerveux central

La protéine VCP interagit avec le domaine SecPH de NF1 pour réguler la densité des épines dendritiques (Wang et al., 2011). De même, la syndécane 2 agit sur la formation des épines dendritiques par l'intermédiaire de la voie NF1/PKA/ENA-VASP (Lin et al., 2007). L'interaction entre le domaine CTD de NF1 et CRMP-2 participe à la formation des neurites (Lin and Hsueh, 2008; Patrakitkomjorn et al., 2008). Par la voie Ras, connue par ailleurs pour son rôle dans la prolifération cellulaire, la neurofibromine régule la sécrétion de GABA, elle-même impliquée dans la potentialisation à long terme au niveau de l'hippocampe (Costa et al., 2002; Cui et al., 2008). Par cette même voie, elle régule également la formation d'AMPC qui, par l'intermédiaire de la voie PKA/Rho/ROCK/MLC, agit sur la formation des neurites (Anastasaki and Gutmann, 2014; Brown et al., 2012). De plus, NF1 semble avoir un impact sur

Discussion

la synthèse de la dopamine, sans que le mécanisme moléculaire mis en jeu soit identifié à ce jour. Cet impact pourrait être à l'origine des troubles de l'attention avec hyperactivité fréquemment observés dans la neurofibromatose de type 1 (Brown et al., 2010b). Enfin, NF1 régule négativement la voie des LIM kinases. Les LIM kinases comportent deux protéines, LIMK1 et LIMK2, toutes deux régulées par la neurofibromine. La région N-terminale de NF1 régule négativement la voie PAK1/Rac1/LIMK1 (Starinsky-Elbaz et al., 2009) tandis que son domaine SecPH, en interagissant avec LIMK2, inhibe l'activation de cette dernière par ROCK (Vallée et al., 2012).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à LIMK2, moins étudiée que LIMK1. Cette protéine est largement impliquée dans la tumorigenèse et la cancérogenèse (Manetti, 2012; Scott and Olson, 2007). A l'instar de LIMK1, elle agit également sur la formation des neurites, qui est un processus crucial pour le développement et le fonctionnement du système nerveux central (Endo et al., 2007; Tastet et al., 2012). Elle pourrait donc être impliquée à la fois dans la formation des tumeurs et dans les troubles cognitifs observés dans la neurofibromatose de type 1. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser exclusivement aux isoformes de LIMK2 retrouvées chez l'homme, et plus particulièrement à l'isoforme LIMK2-1, qui pourrait jouer un rôle important dans le système nerveux central. En effet, au cours d'une thèse précédente, un variant rare de LIMK2-1 a été associé à la déficience intellectuelle. Il a également été montré que cette isoforme était spécifique de certains primates (Tastet, 2012).

L'objectif de ce travail de thèse était de caractériser l'isoforme LIMK2-1, très peu décrite dans la littérature, d'un point de vue cellulaire et moléculaire, afin de mieux comprendre son implication dans les troubles cognitifs et dans la neurofibromatose de type 1.

Une isoforme spécifique des hominidés

Dans un premier temps, nous avons complété ces données et montré que LIMK2-1 n'existait que chez les hominidés, qui correspondent à la branche des primates les plus proches de l'homme. Peu d'études portent sur des gènes ou des protéines spécifiques des hominidés. En revanche, de nombreux travaux font état de gènes ou de mécanismes de régulations des gènes spécifiques des primates et associés à des troubles cérébraux complexes. Par exemple, une isoforme spécifique des primates de *KCNH2* (Potassium

voltage-gated channel subfamily H member 2), qui affecte la physiologie corticale, la cognition et la repolarisation neuronale, a été associée à la schizophrénie (Huffaker et al., 2009), de même que la protéine DAOA, spécifique des primates, et dont l'isoforme la plus longue n'est retrouvée que chez l'homme. Cette protéine perturberait les fonctions mitochondriales, mais le mécanisme moléculaire impliqué reste toutefois à déterminer (Chumakov et al., 2002; Drews et al., 2013). Certains polymorphismes spécifiques des primates situés en amont du site de transcription des gènes ont également été associés à des troubles psychiatriques. Ainsi, une mutation située en amont du site de transcription du gène *CALR* (Calréticuline) chez l'homme a été associée à des troubles psychotiques et des troubles cognitifs sévères. Cette mutation transforme une cytosine en adénine, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de *CALR*. Il est intéressant de noter que cet allèle contenant une adénine, rare et associée à des troubles psychiatriques chez l'homme, est majoritaire chez la plupart des autres espèces. La diminution de l'expression de *CALR*, due au remplacement de l'adénine par la cytosine, pourrait être impliquée dans le développement de mécanismes cognitifs propres à l'homme (Esmailzadeh-Gharehdaghi et al., 2011; Farokhashtiani et al., 2011). Par ailleurs, il existe une répétition en tandem de 4 nucléotides, spécifique des primates, retrouvée dans le promoteur du gène *CYTH4* (Cytohésine 4) et liée aux troubles de l'humeur, dont les troubles bipolaires (Rezazadeh et al., 2015a). Cette répétition de nucléotides pourrait également avoir un rôle protecteur contre certains mécanismes neurodégénératifs (Rezazadeh et al., 2015b). Il a été montré par ailleurs que la surexpression de la protéine Caspase 4, également spécifique des primates, était associée au déclin cognitif dans la maladie d'Alzheimer (Kajiwara et al., 2009). Ces données confirment non seulement l'importance de l'étude de protéines spécifiques des primates pour la compréhension des troubles cognitifs, mais montrent également l'une des limites de l'utilisation de modèles murins, chez lesquels ces protéines n'existent pas.

Expression de LIMK2-1 dans le système nerveux central

Au début de ce travail, l'expression de LIMK2-1 avait seulement été montrée sous forme d'ARNm dans des cellules de la lignée d'ostéosarcome humain Saos-2 (Croft et al., 2011). Nous avons étudié son expression, en tenant compte des contraintes liées à l'absence d'expression de cette isoforme chez les modèles habituellement employés pour ce type

Discussion

d'étude, c'est-à-dire le rat ou la souris. Notre travail a donc porté sur des lignées cellulaires, sur des ADNc et des protéines extraits de tissus humains. Au niveau des lignées cellulaires d'embryon de rein humain (HEK), nous avons mis en évidence, pour la première fois, l'existence d'une protéine LIMK2-1. Au niveau des tissus humains, nous avons tout d'abord montré l'expression de l'ADNc de l'isoforme dans le cerveau fœtal, le cortex, l'hippocampe et le cervelet adultes humains. Par séquençage, nous avons confirmé que le fragment obtenu correspondait bien à LIMK2-1.

Par la suite, nous avons identifié une protéine à la masse moléculaire attendue au niveau du cerveau fœtal et du cortex. Il semble qu'une protéine de la même masse moléculaire soit également exprimée dans le cervelet, mais de manière beaucoup plus faible. Ces résultats peuvent être discutés. En effet, bien que le Western blot effectué ait été répété, seule une série d'échantillons a été étudiée. De plus, les échantillons de cerveau adulte ont été prélevés à des âges différents : 26 ans pour le cortex et le cervelet, et 82 ans pour l'hippocampe. L'expression de LIMK2-1 pourrait être variable au cours de la vie, ce qui pourrait expliquer, par exemple, l'absence de protéine dans l'hippocampe. Néanmoins, ces résultats renforcent l'idée d'un rôle de cette isoforme dans le fonctionnement cérébral. Par la suite, il serait également intéressant d'étudier l'expression de LIMK2-1 dans d'autres tissus et de voir dans quelle mesure elle est co-exprimée avec les isoformes LIMK2-2a et LIMK2-2b.

Caractérisation moléculaire de LIMK2-1

Parallèlement à ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle moléculaire de LIMK2-1. Les LIM kinases sont connues pour phosphoryler la cofiline sur sa sérine 3. Leur action, combinée à celle des slingshots, de la chronophine et/ou des phosphatases 1 et 2A, participe à la régulation de la dynamique de l'actine (Arber et al., 1998b; Gohla et al., 2005; Maekawa et al., 1999; Meberg et al., 1998; Niwa et al., 2002; Sumi et al., 1999; Yang et al., 1998b). Les LIMK régulent également la stabilité des microtubules. Elles sont impliquées dans le réarrangement des microtubules astraux, l'intégrité du centrosome et l'orientation du fuseau mitotique. De plus, LIMK2 joue un rôle dans l'intégrité du fuseau mitotique et dans la sensibilité aux drogues déstabilisant les microtubules (Heng et al., 2012; Po'uha et al., 2010). Enfin, LIMK1 possède également un rôle nucléaire, en régulant deux facteurs de

transcription : CREB et NURR1 (Sacchetti et al., 2006; Todorovski et al., 2015; Yang et al., 2004a).

Les isoformes LIMK2-2a, LIMK2-2b et LIMK2-1 présentent des structures légèrement différentes. Les trois possèdent deux domaines LIM, un domaine PDZ, un domaine S/P et un domaine kinase. Le premier domaine LIM en N-terminal de LIMK2-2b et de LIMK2-1 est tronqué, tandis que la région C-terminale de LIMK2-1 possède un domaine kinase tronqué de quelques acides aminés et un domaine putatif inhibiteur de la phosphatase 1. Plusieurs questions se sont posées : la délétion en C-terminal de LIMK2-1 par rapport aux autres isoformes a-t-elle un impact sur la fonctionnalité du domaine kinase ? Quel est le rôle du domaine PP1i ? Inhibe-t-il la phosphatase 1 ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé plusieurs constructions : chacune des trois isoformes, l'isoforme LIMK2-2a délétée de sa région C-terminale (LIMK2-2a Δ Cter) et l'isoforme LIMK2-1 sans domaine PP1i (LIMK2-1 Δ PP1i), qui correspond également à l'isoforme LIMK2-2b délétée de sa région C-terminale. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de ces constructions sur la formation des fibres de stress, normalement observées après une surexpression de LIMK2 (Maekawa et al., 1999; Sumi et al., 2001a; Vallée et al., 2012).

Rôle de la région C-terminale de LIMK2-2a dans l'activité kinase et la formation des fibres de stress

Nous avons tout d'abord montré que LIMK2-1 favorisait l'apparition de fibres de stress, mais que ces dernières étaient moins nombreuses que celles formées suite à l'expression de LIMK2-2a ou LIMK2-2b. Deux hypothèses ont alors pu être formulées : soit la délétion de quelques résidus en C-terminale du domaine kinase de LIMK2-1 empêcherait cette isoforme de phosphoryler correctement la cofiline, soit le domaine PP1i, en se repliant sur le domaine kinase, limiterait l'interaction entre ce dernier et la cofiline, inhibant ainsi la formation des fibres de stress. Nous avons montré, d'une part, que les cellules surexprimant LIMK2-2a Δ Cter ou LIMK2-1 Δ PP1i présentaient moins de fibres de stress que celles surexprimant LIMK2-1, mais plus que celles surexprimant LARP6, notre témoin négatif.

Discussion

D'autre part, nous avons montré que LIMK2-1 ne phosphorylait pas la cofiline, de même que LIMK2-2a Δ Cter ou LIMK2-1 Δ PP1i, que ce soit de manière endogène suite à une transfection ou *in vitro*. Ces résultats favorisent donc la première hypothèse et mettent en évidence un rôle crucial de la région C-terminale de LIMK2-2a et 2b, comprenant les derniers résidus du domaine kinase et la partie C-terminale située en aval, sur la formation des fibres de stress.

Hypothèse d'un rôle de LIMK2-1 dans la dimérisation des isoformes de LIMK2

Il est à noter que les constructions tronquées ont aussi un effet, bien que moins important que les protéines entières, sur la formation des fibres de stress. Ces constructions pourraient former des dimères N-terminal/N-terminal (voir le paragraphe II.3.2.1.3 de l'introduction) avec les protéines endogènes, les stabiliser et favoriser leur action sur les fibres de stress.

La stabilisation de LIMK1 par homodimérisation N-terminal/N-terminal a été montrée, suite à l'action de la protéine Hsp90 (Li et al., 2006). L'acide aminé impliqué dans ce mécanisme est conservé dans la protéine LIMK2. Le rôle d'Hsp90 sur une éventuelle dimérisation de LIMK2 n'a pas été étudié. En revanche, le Dr Vallée de l'équipe du Dr. Bénédicti a mis en évidence une dimérisation des isoformes de LIMK2 les unes avec les autres (Figure 57). Cette dimérisation pourrait stabiliser les protéines, favorisant leur action sur la cofiline et donc sur la formation des fibres de stress.

De fait, des résultats préliminaires montrent qu'une co-transfection de LIMK2-2a et de LIMK2-1 entraîne une nette augmentation du taux de cofiline phosphorylée par rapport à une co-transfection de LARP6 et de LIMK2-2a. En revanche, lorsque LARP6 et LIMK2-1 sont co-transfectés, le taux de cofiline phosphorylé est comparable à celui obtenu pour le témoin négatif (Figure 58). Ainsi, LIMK2-1 seule ne favorise pas la phosphorylation de la cofiline, ce qui pose la question du rôle moléculaire de LIMK2-1 et indique donc plutôt un rôle régulateur de LIMK2-1 sur les autres isoformes de LIMK2.

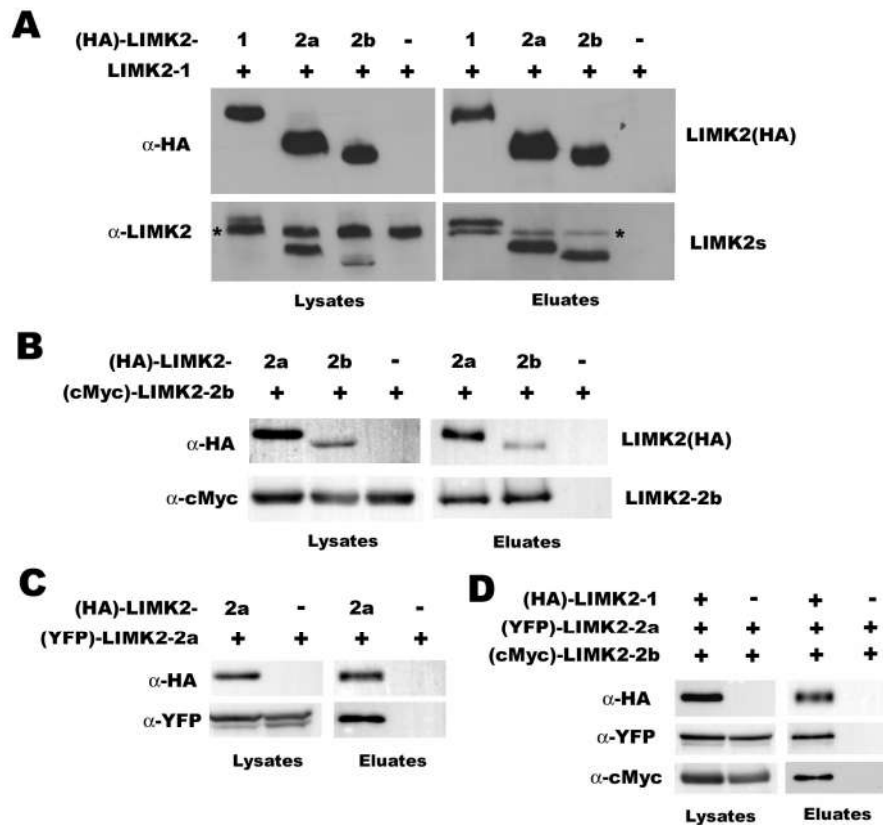


Figure 57 : Formation de dimères à partir des isoformes de LIMK2

(A) *LIMK2-1* interagit avec elle-même, avec *LIMK2-2a* et *2b*. Des cellules HEK-293 ont été co-transfectées avec *LIMK2-1* et une des trois isoformes de HA-*LIMK2* ou le plasmide vide pcDNA3. Les lysats et les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot anti-HA et anti-*LIMK2* (* : *LIMK2-1* non tagguée). (B) *LIMK2-2b* interagit avec elle-même et avec *LIMK2-2a*. Des HEK-293 ont été co-transfectées avec *LIMK2-2b* tagguée cMyc et *LIMK2-2a* ou *LIMK2-2b* tagguée HA ou le plasmide vide pcDNA3. Les lysats et les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot anti-HA et anti-cMyc. (C) *LIMK2-2a* interagit avec elle-même. Les cellules HEK-293 ont été co-transfectées avec *LIMK2-2a* tagguée YFP et *LIMK2-2a* tagguée HA ou le plasmide vide pcDNA3. Les lysats et les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot anti-HA et anti-YFP. (D) Les trois isoformes interagissent ensemble. Les HEK-293 ont été co-transfectées avec HA-*LIMK2-1* ou le plasmide vide pcDNA3, *LIMK2-2a* tagguée YFP et *LIMK2-2b* tagguée cMyc. Les lysats et les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot anti-HA, anti-YFP et anti-cMyc.

Discussion

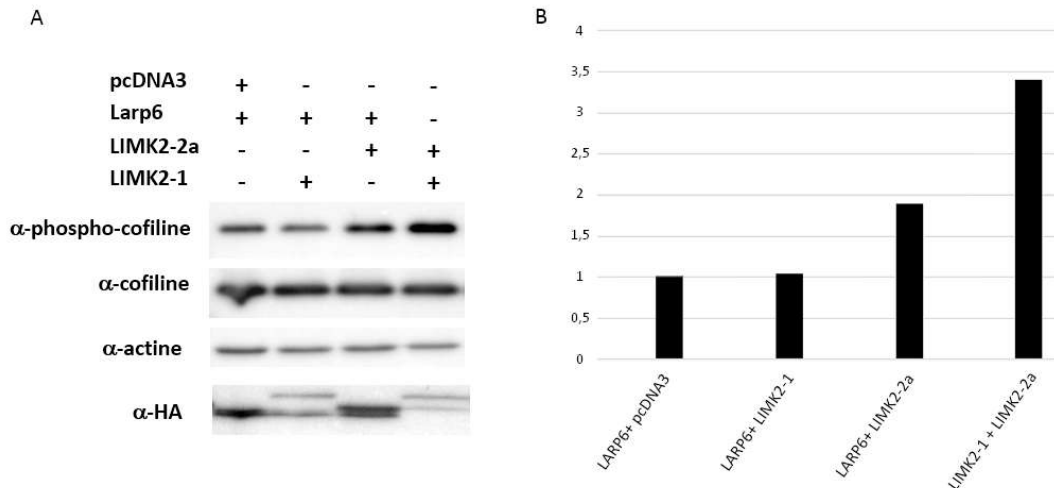


Figure 58 : Synergie entre LIMK2-2a et LIMK2-1 sur la phosphorylation de la cofiline (A) Les HEK-293 ont été co-transfectées avec LARP6 et pcDNA3 ou LIMK2-1 ou LIMK2-2a, ou LIMK2-1 et LIMK2-2a tagguées HA. Les lysats ont été analysés par Western blot anti-phospho-cofiline, anti-cofiline, anti-actine et anti-HA. (B) Taux de phospho-cofiline par rapport au taux de cofiline totale pour chaque condition, normalisé par rapport au témoin négatif LARP6 + pcDNA3.

L'action synergique des deux isoformes LIMK2-2a et LIMK2-1 pour favoriser la phosphorylation de la cofiline pourrait être due à une hétérodimérisation des deux isoformes, qui stabiliserait LIMK2-2a, augmentant ainsi son activité kinase sur la cofiline. Il existe une seconde possibilité : LIMK2-2a pourrait phosphoryler la cofiline tandis que LIMK2-1 pourrait inhiber la déphosphorylation de la cofiline grâce à son domaine PP1i (Figure 59). Cette hypothèse n'est bien entendu pas incompatible avec la première. La co-transfection de LIMK2-2a avec LIMK2-1 Δ PP1i permettrait d'évaluer l'importance relative de chacune de ces hypothèses dans l'augmentation du taux de cofiline phosphorylée.

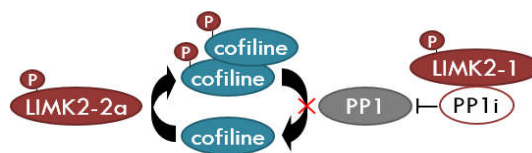


Figure 59 : Modèle de fonctionnement synergique de LIMK2-2a et de LIMK2-1 LIMK2-2a phosphorylerait la cofiline tandis que LIMK2-1 inhiberait la phosphatase 1 (PP1), ce qui empêcherait la déphosphorylation de la cofiline et conduirait à une augmentation de la cofiline phosphorylée.

D'autre part, si nous considérons que la dimérisation observée pour LIMK1 est dépendante de la proline 394 (Li et al., 2006), nous pourrions modifier la proline homologue

de LIMK2 (Pro386) par mutagenèse dirigée. Il faudrait alors vérifier que la protéine ainsi formée phosphoryle toujours la cofiline. Puis nous pourrions co-transfecter ce mutant étiqueté HA et le même mutant étiqueté Flag, par exemple. Si ces mutants ne forment plus de dimères, nous pourrions alors étudier la phosphorylation de la cofiline suite à cette co-transfection, par rapport à une co-transfection de LIMK2 non mutée et une co-transfection de témoins négatifs tels que LARP6 et pcDNA3 par exemple.

Activité kinase de LIMK2-1

Le Dr. Vallée a montré que LIMK2-1 phosphorylait la protéine MBP (Myelin basic protein) de la même façon que LIMK2-2a ou LIMK2-2b. MBP est substrat non spécifique de nombreuses kinases. Ainsi, LIMK2-1 possède effectivement une activité kinase. Son substrat cellulaire reste toutefois à déterminer. Il serait également intéressant d'étudier la phosphorylation de MBP par LIMK2-2a Δ Cter ou LIMK2-1 Δ PP1i, afin de confirmer que LIMK2-1 phosphoryle MBP grâce à son domaine kinase. Des études protéomiques sont en cours afin d'identifier des partenaires spécifiques de LIMK2-1 qui pourraient être de nouveaux substrats.

Localisation subcellulaire de LIMK2-1

Nous avons également pu observer que, contrairement à LIMK2-2a et LIMK2-2b, l'isoforme LIMK2-1 est exclusivement cytoplasmique. De manière intéressante, LIMK2-2a Δ Cter et LIMK2-1 Δ PP1i n'apparaissent également que dans le cytoplasme. Toutefois, les signaux de localisation nucléaire de LIMK2 ne sont pas situés au niveau du domaine C-terminal tronqué, mais entre le domaine PDZ et le domaine kinase pour l'un, et dans une autre partie du domaine kinase pour l'autre (Goyal et al., 2006) (Figure 60). L'absence de la région C-terminale pourrait entraîner un repliement tridimensionnel de la protéine qui masquerait le signal de localisation nucléaire ou favoriserait une interaction avec une autre protéine qui empêcherait le transport nucléaire. Nous pouvons également noter que, si plusieurs études décrivent un rôle de LIMK1 dans le noyau (Sacchetti et al., 2006; Todorovski et al., 2015; Yang et al., 2004a), aucune n'a porté sur un rôle nucléaire potentiel de LIMK2 à ce jour.

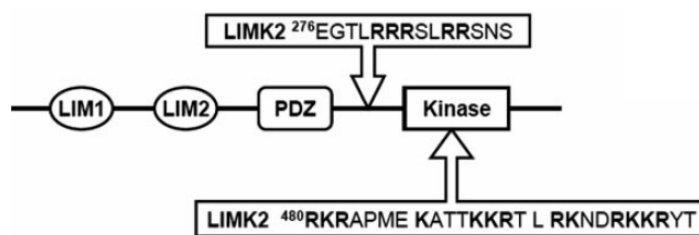


Figure 60 : Prédiction des signaux de localisation nucléaire de LIMK2
 Les positions des régions riches en acides aminés basiques pour LIMK2 sont encadrées (Goyal et al., 2006).

Rôle du domaine PP1i

Afin d'étudier le rôle du domaine PP1i, nous avons tout d'abord étudié l'interaction entre chacune des isoformes ou le domaine PP1i seul et PP1. Ce premier travail nous a permis de mettre en évidence une interaction entre chacune des isoformes de LIMK2 et PP1. Nous avons également pu noter que l'isoforme LIMK2-1 interagissait plus fortement avec PP1 que les deux autres isoformes. Nous avons vu que les phosphatases étaient capables d'interagir avec un grand nombre de protéines différentes, qui les régulent ou leur permettent d'adhérer spécifiquement à leur substrat. Afin d'assurer la spécificité de cette interaction, PP1 interagit, d'une part, avec la séquence consensus R/K-V/I-X-F (Egloff et al., 1997), retrouvée dans le domaine kinase des trois isoformes de LIMK2. D'autre part, nous avons montré qu'elle interagissait avec une deuxième séquence, qui confère à l'interaction sa spécificité, et qui se situe au niveau du domaine PP1i.

Dans un second temps, nous avons élaboré un protocole visant à étudier le rôle de LIMK2-1 sur la déphosphorylation de la cofiline de deux manières différentes et complémentaires, en nous basant sur les travaux de Niwa et collaborateurs (Niwa et al., 2002). Pour cela, nous avons préparé deux constructions : l'une de la cofiline dans un vecteur d'expression eucaryote (pEN-6His-Cofiline) et l'autre de la cofiline dans un plasmide bactérien (pET45-6His-Cofiline). Le premier, pEN-6His-Cofiline a été transfecté dans des cellules HEK-293. Nous avons ensuite purifié la cofiline grâce à des billes 6His et obtenu une quantité importante de cofiline phosphorylée, que nous avons aliquoté et stocké à -80°C. Par la suite, nous voudrions, dans un premier temps, trouver les conditions de déphosphorylation de cette cofiline *in vitro* par PP1 étiquetée Flag et purifiée par élution des billes anti-Flag grâce

à un peptide compétiteur. Dans un second temps, nous voudrions mettre la cofiline-6His phosphorylée en présence de la quantité requise de PP1 étiquetée Flag purifiée et de LIMK2-1 ou de LARP6 étiquetées HA et également purifiées par immunoprécipitation à l'aide de billes anti-HA, ce afin de voir si la présence de LIMK2-1 empêche la déphosphorylation de la cofiline. Les résultats seront analysés par Western blot anti-HA, anti-Flag, anti-6His, anti-cofiline et anti-phospho-cofiline.

Nous voudrions également produire la cofiline dans des bactéries *E. coli*, afin de purifier la cofiline non phosphorylée qui sera ensuite phosphorylée *in vitro* en présence de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. De la même façon que précédemment, nous voudrions ensuite, dans un premier temps, trouver les conditions de déphosphorylation de cette cofiline *in vitro* par PP1 puis, dans un second temps, étudier l'impact de LIMK2-1 sur cette déphosphorylation par autoradiographie.

Parallèlement à ce travail, le Dr Vallée a étudié l'impact de LIMK2-1 sur la déphosphorylation de la cofiline *in vivo*. Pour cela, elle a observé le taux de cofiline phosphorylée par rapport au taux de cofiline totale dans des cellules HEK-293 co-transfectées soit par la galectine et LARP6, soit par PP1 et LARP6, soit par PP1 et LIMK2-1. Ses résultats montrent, d'une part, que PP1 diminue bien le taux de cofiline phosphorylée. D'autre part, ils mettent en évidence une tendance de LIMK2-1 à inhiber la diminution du taux de cofiline phosphorylée en présence de PP1 (Figure 61).

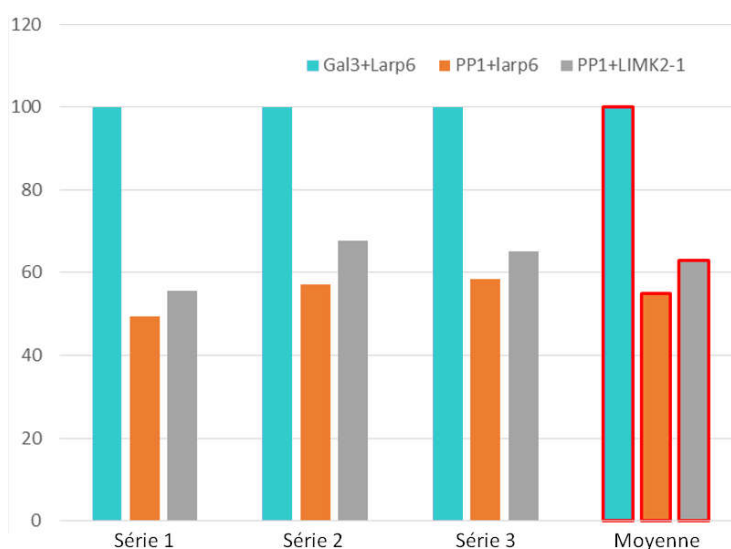


Figure 61 : Impact de LIMK2-1 sur la déphosphorylation de la cofiline due à PP1
L'étude a été réalisée sur trois séries comparables, montrant une tendance de LIMK2-1 à inhiber l'action de PP1 sur la cofiline.

Discussion

Nous pouvons noter que l'inhibition de la déphosphorylation de la cofiline par LIMK2-1 reste relativement faible *in vivo*. Dans la littérature, nous avons vu que la phosphorylation d'une thréonine, conservée entre PHI-1 et CPI-17, favorisait l'activité de ces deux inhibiteurs de phosphatase (Deng et al., 2002; Eto et al., 1999). Nous avons également vu que la substitution de cette thréonine en acide aspartique mimant la phosphorylation conduisait à une suractivation de CPI-17 (Ohki et al., 2003). Cette thréonine est également conservée dans le domaine PP1i de LIMK2-1. Nous avons donc construit un mutant de LIMK2-1, portant un acide aspartique à la place de cette thréonine en position 594 (LIMK2-1T594D). Ce mutant a été utilisé pour l'expérience *in vivo* que nous venons de présenter, mais ne permet pas de mettre en évidence une plus grande inhibition de la déphosphorylation de la cofiline. L'impact de cette substitution d'une thréonine en alanine pourrait être déjà diminué pour PHI-1, plus proche du domaine PP1i de LIMK2-1 que CPI-17. Le domaine PP1i de LIMK2-1 pourrait aussi être régulé différemment.

Il est également possible que l'isoforme LIMK2-1 soit peu stable dans la cellule. Il est intéressant de noter que pour obtenir une quantité de protéines comparable, nous devons transfecter 20 µg de plasmide HA-LIMK2-1, contre 10 µg pour HA-LIMK2-2b et 5 µg pour HA-LIMK2-2a. Dans ce cas, la co-transfection de LIMK2-2a et de LIMK2-1 pourrait stabiliser LIMK2-1, ce qui favoriserait son inhibition de la déphosphorylation de la cofiline, préalablement phosphorylée par LIMK2-2a.

Impact moléculaire du variant p.S668P

Au cours de la thèse précédente, un variant a été identifié dans la séquence codant le domaine PP1i. Ce variant (rs151191437) entraîne la substitution d'une sérine en proline en position 668 de LIMK2-1, suite à la transition d'une thymine en cytosine. Il est retrouvé chez 2,3 % des patients atteints de déficience intellectuelle (DI) inclus dans l'étude (Tastet, 2012).

Il semble important ici de revenir sur la définition et, plus particulièrement, sur l'étiologie de la DI. Avec une prévalence comprise entre 1 et 3 %, la DI constitue un enjeu majeur de santé publique (Perou et al., 2013). Elle se caractérise notamment par une valeur de QI inférieure à 70, bien que d'autres critères doivent être pris en compte (American Psychiatric Association et al., 2013). Les causes de la DI sont extrêmement hétérogènes. Elles sont environnementales dans 14 % des cas (malnutrition pendant la grossesse, toxicité

environnementale, naissance prématuré, ischémie cérébrale, syndrome d'alcoolisme foetal, infection foetale ou post-natale). Dans environ 25 % des cas, elles sont génétiques et de nombreux mécanismes ont été impliqués : on retrouve des anomalies cytogénétiques (aneuploïdies, translocations, délétions et duplications de grande taille par exemple) ou infracytogénétique (microdélétions et microduplications interstitielles ou subtélomériques), des maladies monogéniques (plus de 290 gènes sont associés à une DI) et des pathologies génétiques complexes, pouvant associer plusieurs variants rares. Dans 60 % des cas, l'étiologie reste, à ce jour, inconnue (van Bokhoven, 2011; Chelly et al., 2006; Srivastava and Schwartz, 2014).

Le variant rs151191437 n'est pas retrouvé dans notre population témoin mais apparaît dans la base de données Exome variant server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) dans 0,63 % des cas. Les personnes chez lesquelles ce variant a été retrouvé sont incluses dans une population témoin, il est néanmoins possible que leurs capacités cognitives se situent à la limite du seuil considéré comme pathologique. Ce variant pourrait également constituer un facteur de risque qui ne serait pas suffisant, à lui seul, pour déclencher la pathologie. Par ailleurs, il a été montré que dans le cas de maladies psychiatriques, l'étude de variants rares permettait souvent d'identifier des effets significatifs de la variation sur le fonctionnement moléculaire de la protéine (Arguello and Gogos, 2012; Zhu et al., 2011). Nous nous sommes donc intéressé à l'impact du variant rs151191437 sur les fonctions moléculaires de LIMK2-1.

Dans un premier temps, nous avons étudié la mutation *in silico*. Nous avons alors observé que la thymine était conservée chez les hominidés possédant cette isoforme. Nous avons également vu que l'homologue de la sérine 668 sur la protéine PHI-1 était très conservé dans l'évolution, ce qui suggère que cette sérine pourrait être importante pour la fonction de la protéine. Nous avons également évalué l'impact de la mutation grâce à deux logiciels : Polyphen2 et Mutation Taster. Il est intéressant de noter que, si le premier suggère que le variant est pathogène, le deuxième le présente comme un simple polymorphisme. Ces résultats peuvent s'expliquer par les données utilisées par ces deux logiciels. En effet, Polyphen2 utilise des bases de données compilant des variations pathogènes et non pathogènes pour prédire l'impact d'une substitution d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine, tandis que Mutation Taster utilise des bases de données non pathogènes et analyse la conservation du nucléotide modifié au cours de l'évolution. Dans le

Discussion

cas de *LIMK2-1*, cette approche pose une limite. En effet, cette isoforme n'étant retrouvée que chez les hominidés, sa conservation au cours de l'évolution ne peut pas être évaluée sur un grand nombre d'espèces. En revanche, lorsque nous utilisons Mutation Taster pour analyser l'impact de la substitution en proline de la sérine 129 de PHI-1, homologue de la sérine 668 de *LIMK2-1*, nous pouvons voir que la mutation est considérée comme pathogène. Par ailleurs, la modélisation de l'impact de la mutation montre que le changement d'acide aminé pourrait entraîner la disparition d'une boucle de l'hélice α située en C-terminal du domaine PP1i. Cette analyse complète notre étude *in silico* et suggère fortement un impact fonctionnel du variant pS668P.

Dans un second temps, nous avons étudié l'impact de la mutation sur la formation des fibres de stress, ainsi que sur l'interaction entre le domaine PP1i muté de *LIMK2-1* et PP1. Les cellules surexprimant *LIMK2-1S668P* présentent des fibres de stress moins nombreuses que celle surexprimant *LIMK2-1*. La mutation perturberait donc le fonctionnement du domaine PP1i. Nous avons également pu noter que les cellules transfectées par *LIMK2-2a Δ Cter* présentent davantage de fibres de stress que celles transfectées par *LIMK2-1 Δ PP1i*. La différence entre ces deux constructions provient de la présence de deux domaines LIM entiers pour la première, contre un domaine LIM tronqué et un domaine LIM entier pour la seconde. La présence des domaines LIM pourrait ainsi peut-être avoir une influence dans la formation des fibres de stress.

Le domaine LIM des LIM kinases peut interagir avec le domaine kinase d'une autre LIM kinase pour former un homodimère (Manetti, 2012). Pour *LIMK1*, la formation de ces dimères N-terminal/C-terminal inhibe l'activité kinase, et l'interaction est d'autant plus forte si le domaine LIM n'est pas tronqué (Hiraoka et al., 1996; Nagata et al., 1999). Le rôle d'une interaction similaire sur *LIMK2* n'a pas été mis en évidence et pourrait être testé. Si ce rôle est confirmé pour *LIMK2*, la présence d'un domaine LIM tronqué pour les isoformes *LIMK2-2b* et *LIMK2-1* devrait réduire la formation de ces dimères inactifs et résulter en la formation de davantage de fibre de stress. Ce n'est pas ce que l'on observe en comparant *LIMK2-2b* avec *LIMK2-2a* et *LIMK2-2a Δ Cter* avec *LIMK2-1 Δ PP1i*. Nos résultats montrent l'inverse. Ces données renforcent l'intérêt d'étudier le phénomène de dimérisation de *LIMK2* afin de mieux comprendre son impact potentiel.

Nous avons également montré que le domaine PP1i muté interagissait moins avec PP1 que le domaine PP1i normal, suggérant également que l'effet de LIMK2-1 sur PP1 pourrait être perturbé par la mutation. Par la suite, il serait intéressant de co-transfecter LIMK2-2a avec LIMK2-1S668P, afin de voir si, lorsque LIMK2-1 est mutée, nous observons toujours une augmentation de la phosphorylation de la cofiline, par rapport à une co-transfection de LIMK2-2a et d'un témoin négatif tel que LARP6. Compte tenu de nos résultats précédents, nous attendons au minimum une diminution du taux de cofiline phosphorylée lorsque LIMK2-1S668P et LIMK2-2a sont co-transfectées, en comparaison avec une co-transfection de LIMK2-1 et de LIMK2-2a.

Vers une étude fonctionnelle

Au cours de la thèse précédente, il a été montré qu'une transfection de LIMK2-1S668P sur des cellules NSC-34 en cours de différenciation entraînait une augmentation de la taille des neurites, par rapport à une transfection de LIMK2-1, suggérant un effet fonctionnel de la mutation sur la croissance des neurites (Tastet, 2012) (partie IV des résultats). Cet impact sur la croissance des neurites est caractéristique de nombreux gènes impliqués dans la déficience intellectuelle (Doers et al., 2014; Jolly et al., 2013; Ramakers, 2002; Van Maldergem et al., 2013). Il est cohérent avec l'idée d'une fonctionnalité du domaine PP1i de LIMK2-1 et d'un rôle similaire entre ce domaine et la protéine PHI-1. En effet, en inhibant PP1, la protéine PHI-1 est impliquée à la fois dans la croissance des neurites (Han et al., 2007; Li et al., 2007; Monroe and Heathcote, 2013) et dans la plasticité synaptique (Hu et al., 2007; Morishita et al., 2001; Munton et al., 2004; Siddoway et al., 2013).

Ces premiers résultats tendent donc à confirmer un rôle de la mutation p.S668P sur le fonctionnement neuronal. Toutefois, le modèle choisi comporte une limite. Les NSC-34 étant des cellules de souris, il est possible que des éléments nécessaires au fonctionnement d'une isoforme spécifique des primates en soient absents. Nous avons donc voulu développer au laboratoire l'utilisation d'un modèle de neurodéveloppement humain avec l'utilisation des cellules SH-SY5Y. Ces cellules sont issues d'un neuroblastome humain et constituent un modèle pour étudier les phases initiales de la différenciation neuronale (de Bittencourt Pasquali et al., 2014). Nous avons pu cultiver ces cellules au laboratoire et nos premiers résultats montrent une tendance de ces cellules à se différencier en présence d'acide

Discussion

rétinoïque. Dans un premier temps, il faudrait confirmer ces résultats. Par la suite, nous pourrions surexprimer LIMK2-1, LIMK2-1 Δ PP1i, LIMK2-1S668P ou un témoin négatif dans ces cellules et mesurer la longueur des neurites au cours du développement. Nous pourrions également étudier l'expression de LIMK2-1 dans ces cellules. Si elle est exprimée, nous pourrions dessiner un siRNA spécifique de cette isoforme et voir l'effet de la suppression de son expression sur notre modèle de neurodéveloppement.

Conclusion

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les troubles cognitifs associés à la neurofibromatose de type 1 sont nombreux et complexes. L'un d'entre eux concerne la voie des LIM kinases, dont le rôle reste encore peu étudié dans le cadre de cette pathologie. Afin de mieux comprendre le rôle de cette voie, il semblait important, dans un premier temps, de mieux comprendre le fonctionnement moléculaire des isoformes de LIMK2.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'isoforme LIMK2-1 de LIMK2, spécifique des hominidés. Nous avons montré, pour la première fois, l'existence de cette isoforme au niveau protéique, ainsi que son expression dans le système nerveux central. Nous avons également mis en évidence un mécanisme moléculaire nouveau pour une protéine de la famille des LIM kinases. En effet, LIMK2-1, à la différence de LIMK2-2a, de LIMK2-2b, et même de LIMK1, ne phosphoryle pas la cofiline mais pourrait inhiber la déphosphorylation de la cofiline grâce à son domaine inhibiteur de la phosphatase 1. De plus, il semble que cette isoforme puisse agir de manière synergique avec d'autres isoformes, pour augmenter le taux de cofiline phosphorylée.

Nous avons également vu que le variant p.S668P, situé au niveau du domaine PP1i de LIMK2-1 et associé à la déficience intellectuelle, pouvait perturber le fonctionnement moléculaire de cette isoforme. Ces données corroborent l'idée d'un rôle de cette isoforme dans le fonctionnement neuronal. Une dérégulation de cette isoforme liée à une absence ou à une diminution de neurofibromine pourrait donc contribuer à l'apparition de troubles cognitifs dans la neurofibromatose de type 1. Le développement d'inhibiteurs des LIM kinases pourrait ainsi palier à la diminution du taux de NF1 au niveau du système nerveux central.

Par ailleurs, des inhibiteurs des LIM kinases sont également synthétisés comme traitement potentiel et prometteur contre certains cancers (Boland et al., 2015; Charles et al., 2015; Mardilovich et al., 2015). En effet, de nombreuses études ont montré un rôle de ces protéines dans des mécanismes néoplasiques (Manetti, 2012; Scott and Olson, 2007). L'implication des LIM kinases dans les cancers liés à la neurofibromatose n'a toutefois pas été étudiée à ce jour, mais le rôle de NF1 dans la régulation de ces protéines indique qu'elles pourraient jouer un rôle dans cet aspect de la maladie. Des inhibiteurs des LIM kinases pourraient donc constituer une voie thérapeutique intéressante à explorer dans la neurofibromatose, tant sur le plan tumoral que cognitif. Il paraît alors primordial de bien

Conclusion

comprendre le rôle moléculaire et cellulaire de ces protéines afin de bien comprendre l'impact du traitement.

Bibliographie

- Abramowicz, A., and Gos, M. (2014). Neurofibromin in neurofibromatosis type 1 - mutations in NF1 gene as a cause of disease. *Dev. Period Med.* *18*, 297–306.
- Acevedo, K., Moussi, N., Li, R., Soo, P., and Bernard, O. (2006). LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *54*, 487–501.
- Acevedo, K., Li, R., Soo, P., Suryadinata, R., Sarcevic, B., Valova, V.A., Graham, M.E., Robinson, P.J., and Bernard, O. (2007). The phosphorylation of p25/TPPP by LIM kinase 1 inhibits its ability to assemble microtubules. *Exp. Cell Res.* *313*, 4091–4106.
- Acosta, M.T., Gioia, G.A., and Silva, A.J. (2006). Neurofibromatosis type 1: new insights into neurocognitive issues. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *6*, 136–143.
- Adams, E.G., Stewart, K.M.A., Borges, O.A., and Darling, T. (2011). Multiple, unilateral lisch nodules in the absence of other manifestations of neurofibromatosis type 1. *Case Rep. Ophthalmol. Med.* *2011*, 854784.
- Ahmadian, M.R., Kiel, C., Stege, P., and Scheffzek, K. (2003). Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP. *J. Mol. Biol.* *329*, 699–710.
- Ahmed, T., Shea, K., Masters, J.R.W., Jones, G.E., and Wells, C.M. (2008). A PAK4-LIMK1 pathway drives prostate cancer cell migration downstream of HGF. *Cell. Signal.* *20*, 1320–1328.
- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., et al. (2001). Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat. Neurosci.* *4*, 367–373.
- Akbarnia, B.A., Gabriel, K.R., Beckman, E., and Chalk, D. (1992). Prevalence of scoliosis in neurofibromatosis. *Spine* *17*, S244–S248.
- Akhshi, T.K., Wernike, D., and Piekny, A. (2014). Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division. *Cytoskelet. Hoboken NJ* *71*, 1–23.
- Alahari, S.K., Lee, J.W., and Juliano, R.L. (2000). Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha5 subunit and inhibits cell migration. *J. Cell Biol.* *151*, 1141–1154.
- Alanne, M.H., Siljamäki, E., Peltonen, S., Väänänen, K., Windle, J.J., Parada, L.F., Määttä, J.A., and Peltonen, J. (2012). Phenotypic characterization of transgenic mice harboring Nf1^{+/-} or Nf1^{-/-} osteoclasts in otherwise Nf1^{+/+} background. *J. Cell. Biochem.* *113*, 2136–2146.
- Albaret, J.M., and Chaix, Y. (2013). Mise au point sur les troubles des apprentissages. *Psychomotricité*.
- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* *15*, 45–56.

Bibliographie

- Allouche, J., Bellon, N., Saidani, M., Stanchina-Chatrousse, L., Masson, Y., Patwardhan, A., Gilles-Marsens, F., Delevoye, C., Domingues, S., Nissan, X., et al. (2015). In vitro modeling of hyperpigmentation associated to neurofibromatosis type 1 using melanocytes derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 9034–9039.
- Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2001). LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J.* *354*, 149–159.
- Amano, T., Kaji, N., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2002). Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis. *J. Biol. Chem.* *277*, 22093–22102.
- American Psychiatric Association, American Psychiatric Association, and DSM-5 Task Force (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*.
- Anastasaki, C., and Gutmann, D.H. (2014). Neuronal NF1/RAS regulation of cyclic AMP requires atypical PKC activation. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 6712–6721.
- Andersen, L.B., Ballester, R., Marchuk, D.A., Chang, E., Gutmann, D.H., Saulino, A.M., Camonis, J., Wigler, M., and Collins, F.S. (1993). A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 487–495.
- Andrews, W.D., Zito, A., Memi, F., Jones, G., Tamamaki, N., and Parnavelas, J.G. (2013). Limk2 mediates semaphorin signalling in cortical interneurons migrating through the subpallium. *Biol. Open* *2*, 277–282.
- Antônio, J.R., Goloni-Bertollo, E.M., and Trídico, L.A. (2013). Neurofibromatosis: chronological history and current issues. *An. Bras. Dermatol.* *88*, 329–343.
- Aravind, L., Neuwald, A.F., and Ponting, C.P. (1999). Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr. Biol.* *9*, R195–R197.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998a). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* *393*, 805–809.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998b). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* *393*, 805–809.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998c). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* *393*, 805–809.
- Arguello, P.A., and Gogos, J.A. (2012). Genetic and cognitive windows into circuit mechanisms of psychiatric disease. *Trends Neurosci.* *35*, 3–13.

- Arun, V., Wiley, J.C., Kaur, H., Kaplan, D.R., and Guha, A. (2013). A novel neurofibromin (NF1) interaction with the leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein links neurofibromatosis type 1 and the French Canadian variant of Leigh's syndrome in a common molecular complex. *J. Neurosci. Res.* 91, 494–505.
- Bajenaru, M.L., Zhu, Y., Hedrick, N.M., Donahoe, J., Parada, L.F., and Gutmann, D.H. (2002). Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (NF1) is insufficient for astrocytoma formation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5100–5113.
- Bajenaru, M.L., Hernandez, M.R., Perry, A., Zhu, Y., Parada, L.F., Garbow, J.R., and Gutmann, D.H. (2003). Optic nerve glioma in mice requires astrocyte Nf1 gene inactivation and Nf1 brain heterozygosity. *Cancer Res.* 63, 8573–8577.
- Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., and Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63, 851–859.
- Bamburg, J.R., and Wiggan, O.P. (2002). ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 12, 598–605.
- Barker, D., Wright, E., Nguyen, K., Cannon, L., Fain, P., Goldgar, D., Bishop, D.T., Carey, J., Baty, B., and Kivlin, J. (1987). Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science* 236, 1100–1102.
- Barron, V.A., and Lou, H. (2012). Alternative splicing of the neurofibromatosis type I pre-mRNA. *Biosci. Rep.* 32, 131–138.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Basu, T.N., Gutmann, D.H., Fletcher, J.A., Glover, T.W., Collins, F.S., and Downward, J. (1992). Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 356, 713–715.
- Beauchamp, G.R. (1995). Neurofibromatosis type 1 in children. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 93, 445–472.
- Bernards, A., Snijders, A.J., Hannigan, G.E., Murthy, A.E., and Gusella, J.F. (1993). Mouse neurofibromatosis type 1 cDNA sequence reveals high degree of conservation of both coding and non-coding mRNA segments. *Hum. Mol. Genet.* 2, 645–650.
- Bernstein, B.W., and Bamburg, J.R. (2010). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* 20, 187–195.
- Billingsley, R.L., Slopis, J.M., Swank, P.R., Jackson, E.F., and Moore, B.D. (2003). Cortical morphology associated with language function in neurofibromatosis, type I. *Brain Lang.* 85, 125–139.

Bibliographie

- Billingsley, R.L., Jackson, E.F., Slopis, J.M., Swank, P.R., Mahankali, S., and Moore, B.D. (2004). Functional MRI of visual-spatial processing in neurofibromatosis, type I. *Neuropsychologia* *42*, 395–404.
- Birkenfeld, J., Betz, H., and Roth, D. (2001). Inhibition of neurite extension by overexpression of individual domains of LIM kinase 1. *J. Neurochem.* *78*, 924–927.
- Birkenfeld, J., Betz, H., and Roth, D. (2003). Identification of cofilin and LIM-domain-containing protein kinase 1 as novel interaction partners of 14-3-3 zeta. *Biochem. J.* *369*, 45–54.
- de Bittencourt Pasquali, M.A., de Ramos, V.M., Albanus, R.D.O., Kunzler, A., de Souza, L.H.T., Dalmolin, R.J.S., Gelain, D.P., Ribeiro, L., Carro, L., and Moreira, J.C.F. (2014). Gene Expression Profile of NF- κ B, Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Mol. Neurobiol.*
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* *94*, 235–263.
- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* *366*, 643–654.
- van Bokhoven, H. (2011). Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 81–104.
- Boland, S., Bourin, A., Alen, J., Geraets, J., Schroeders, P., Castermans, K., Kindt, N., Boumans, N., Panitti, L., Vanormelingen, J., et al. (2015). Design, synthesis and biological characterization of selective LIMK inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *25*, 4005–4010.
- Bollag, G., McCormick, F., and Clark, R. (1993). Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J.* *12*, 1923–1927.
- Bollag, G., Clapp, D.W., Shih, S., Adler, F., Zhang, Y.Y., Thompson, P., Lange, B.J., Freedman, M.H., McCormick, F., Jacks, T., et al. (1996). Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat. Genet.* *12*, 144–148.
- Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M.J., and Beullens, M. (2010). The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 450–458.
- Boyanapalli, M., Lahoud, O.B., Messiaen, L., Kim, B., Anderle de Sylor, M.S., Duckett, S.J., Somara, S., and Mikol, D.D. (2006). Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *340*, 1200–1208.
- Boyd, K.P., Gao, L., Feng, R., Beasley, M., Messiaen, L., Korf, B.R., and Theos, A. (2010). Phenotypic variability among café-au-lait macules in neurofibromatosis type 1. *J. Am. Acad. Dermatol.* *63*, 440–447.
- Brazel, C.Y., Romanko, M.J., Rothstein, R.P., and Levison, S.W. (2003). Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog. Neurobiol.* *69*, 49–69.

- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B., and Saxton, W.M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science* 289, 2120–2122.
- Brown, J.A., Gianino, S.M., and Gutmann, D.H. (2010a). Defective cAMP generation underlies the sensitivity of CNS neurons to neurofibromatosis-1 heterozygosity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 5579–5589.
- Brown, J.A., Emmett, R.J., White, C.R., Yuede, C.M., Conyers, S.B., O'Malley, K.L., Wozniak, D.F., and Gutmann, D.H. (2010b). Reduced striatal dopamine underlies the attention system dysfunction in neurofibromatosis-1 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4515–4528.
- Brown, J.A., Diggs-Andrews, K.A., Gianino, S.M., and Gutmann, D.H. (2012). Neurofibromatosis-1 heterozygosity impairs CNS neuronal morphology in a cAMP/PKA/ROCK-dependent manner. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 13–22.
- Cashman, N.R., Durham, H.D., Blusztajn, J.K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I.T., Dahrouge, S., and Antel, J.P. (1992). Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 194, 209–221.
- Castle, B., Baser, M.E., Huson, S.M., Cooper, D.N., and Upadhyaya, M. (2003). Evaluation of genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1. *J. Med. Genet.* 40, e109.
- Chakrabarti, R., Jones, J.L., Oelschlager, D.K., Tapia, T., Tousson, A., and Grizzle, W.E. (2007). Phosphorylated LIM kinases colocalize with gamma-tubulin in centrosomes during early stages of mitosis. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 2944–2952.
- Charles, M.D., Brookfield, J.L., Ekwuru, T.C., Stockley, M., Dunn, J., Riddick, M., Hammonds, T., Trivier, E., Greenland, G., Wong, A.C., et al. (2015). Discovery, Development, and SAR of Aminothiazoles as LIMK Inhibitors with Cellular Anti-Invasive Properties. *J. Med. Chem.* 58, 8309–8313.
- Chautard, H., Jacquet, M., Schoentgen, F., Bureaud, N., and Bénédicti, H. (2004). Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the Ira2p but not the Ira1p Ras GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 3, 459–470.
- Chelly, J., Khelifaoui, M., Francis, F., Chérif, B., and Bienvenu, T. (2006). Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 14, 701–713.
- Chen, X., and Macara, I.G. (2006). Par-3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly. *J. Cell Biol.* 172, 671–678.
- Chen, C.H., Wang, H.C., and Chuang, N.N. (2000). Interaction of shrimp ras protein with mammalian caveolin-1. *J. Exp. Zool.* 287, 432–439.
- Chen, Q., Peto, C.A., Shelton, G.D., Mizisin, A., Sawchenko, P.E., and Schubert, D. (2009). Loss of modifier of cell adhesion reveals a pathway leading to axonal degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 118–130.

Bibliographie

- Chen, X.Q., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1999). The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 19901–19905.
- Chen, Y., Soong, J., Mohanty, S., Xu, L., and Scott, G. (2013). The neural guidance receptor Plexin C1 delays melanoma progression. *Oncogene* *32*, 4941–4949.
- Cheng, A.K., and Robertson, E.J. (1995). The murine LIM-kinase gene (*limk*) encodes a novel serine threonine kinase expressed predominantly in trophoblast giant cells and the developing nervous system. *Mech. Dev.* *52*, 187–197.
- Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1110–1121.
- Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M., Abderrahim, H., Bougueleret, L., Barry, C., Tanaka, H., Rosa, P.L., et al. (2002). Genetic and physiological data implicating the new human gene *G72* and the gene for d-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 13675–13680.
- Cichowski, K., Santiago, S., Jardim, M., Johnson, B.W., and Jacks, T. (2003). Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. *Genes Dev.* *17*, 449–454.
- Cingolani, L.A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 344–356.
- Clements-Stephens, A.M., Rimrodt, S.L., Gaur, P., and Cutting, L.E. (2008). Visuospatial processing in children with neurofibromatosis type 1. *Neuropsychologia* *46*, 690–697.
- Colman, S.D., Williams, C.A., and Wallace, M.R. (1995). Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. *Nat. Genet.* *11*, 90–92.
- Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 319–332.
- Costa, R.M., Federov, N.B., Kogan, J.H., Murphy, G.G., Stern, J., Ohno, M., Kucherlapati, R., Jacks, T., and Silva, A.J. (2002). Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature* *415*, 526–530.
- Crawford, A.H., and Schorry, E.K. (1999). Neurofibromatosis in children: the role of the orthopaedist. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* *7*, 217–230.
- Croft, D.R., and Olson, M.F. (2006). The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 4612–4627.
- 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. (2011). p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res.* *21*, 666–682.

- Cuberos, H., Vallée, B., Vourc'h, P., Tastet, J., Andres, C.R., and Bénédicti, H. (2015). Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction. *FEBS Lett.* 589, 3795–3806.
- Cui, Y., Costa, R.M., Murphy, G.G., Elgersma, Y., Zhu, Y., Gutmann, D.H., Parada, L.F., Mody, I., and Silva, A.J. (2008). Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell* 135, 549–560.
- Cutting, L.E., Koth, C.W., and Denckla, M.B. (2000). How children with neurofibromatosis type 1 differ from “typical” learning disabled clinic attenders: nonverbal learning disabilities revisited. *Dev. Neuropsychol.* 17, 29–47.
- Cutting, L.E., Cooper, K.L., Koth, C.W., Mostofsky, S.H., Kates, W.R., Denckla, M.B., and Kaufmann, W.E. (2002). Megalencephaly in NF1: predominantly white matter contribution and mitigation by ADHD. *Neurology* 59, 1388–1394.
- Daginakatte, G.C., and Gutmann, D.H. (2007). Neurofibromatosis-1 (Nf1) heterozygous brain microglia elaborate paracrine factors that promote Nf1-deficient astrocyte and glioma growth. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1098–1112.
- Daginakatte, G.C., Gianino, S.M., Zhao, N.W., Parsadian, A.S., and Gutmann, D.H. (2008). Increased c-Jun-NH2-kinase signaling in neurofibromatosis-1 heterozygous microglia drives microglia activation and promotes optic glioma proliferation. *Cancer Res.* 68, 10358–10366.
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., and Minden, A. (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J. Biol. Chem.* 276, 32115–32121.
- Dan, S., Tsunoda, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Zembutsu, H., Katagiri, T., Yamazaki, K., Nakamura, Y., and Yamori, T. (2002). An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res.* 62, 1139–1147.
- D’Angelo, I., Welti, S., Bonneau, F., and Scheffzek, K. (2006). A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep.* 7, 174–179.
- Danowski, B.A. (1989). Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J. Cell Sci.* 93 (Pt 2), 255–266.
- Dasgupta, B., and Gutmann, D.H. (2005). Neurofibromin regulates neural stem cell proliferation, survival, and astroglial differentiation in vitro and in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 5584–5594.
- Dasgupta, B., Dugan, L.L., and Gutmann, D.H. (2003). The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8949–8954.
- Daston, M.M., and Ratner, N. (1992). Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 195, 216–226.

Bibliographie

- Daston, M.M., Scrabble, H., Nordlund, M., Sturbaum, A.K., Nissen, L.M., and Ratner, N. (1992). The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 8, 415–428.
- Davila, M., Frost, A.R., Grizzle, W.E., and Chakrabarti, R. (2003). LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 278, 36868–36875.
- Dawe, H.R., Minamide, L.S., Bamburg, J.R., and Cramer, L.P. (2003). ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr. Biol. CB* 13, 252–257.
- DeBella, K., Szudek, J., and Friedman, J.M. (2000). Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics* 105, 608–614.
- DeClue, J.E., Cohen, B.D., and Lowy, D.R. (1991). Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9914–9918.
- DeClue, J.E., Papageorge, A.G., Fletcher, J.A., Diehl, S.R., Ratner, N., Vass, W.C., and Lowy, D.R. (1992). Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* 69, 265–273.
- Deng, J.T., Sutherland, C., Brautigan, D.L., Eto, M., and Walsh, M.P. (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem. J.* 367, 517–524.
- Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83–117.
- Descheemaeker, M.-J., Ghesquière, P., Symons, H., Fryns, J.P., and Legius, E. (2005). Behavioural, academic and neuropsychological profile of normally gifted Neurofibromatosis type 1 children. *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR* 49, 33–46.
- De Schepper, S., Boucneau, J.M.A., Westbroek, W., Mommaas, M., Onderwater, J., Messiaen, L., Naeyaert, J.-M.A.D., and Lambert, J.L.W. (2006). Neurofibromatosis type 1 protein and amyloid precursor protein interact in normal human melanocytes and colocalize with melanosomes. *J. Invest. Dermatol.* 126, 653–659.
- DesMarais, V., Ghosh, M., Eddy, R., and Condeelis, J. (2005). Cofilin takes the lead. *J. Cell Sci.* 118, 19–26.
- Diggs-Andrews, K.A., and Gutmann, D.H. (2013). Modeling cognitive dysfunction in neurofibromatosis-1. *Trends Neurosci.* 36, 237–247.
- Diggs-Andrews, K.A., Brown, J.A., Gianino, S.M., Rubin, J.B., Wozniak, D.F., and Gutmann, D.H. (2014). Sex Is a major determinant of neuronal dysfunction in neurofibromatosis type 1. *Ann. Neurol.* 75, 309–316.
- Dilts, C.V., Carey, J.C., Kircher, J.C., Hoffman, R.O., Creel, D., Ward, K., Clark, E., and Leonard, C.O. (1996). Children and adolescents with neurofibromatosis 1: a behavioral phenotype. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* 17, 229–239.

- Ding, Y., Milosavljevic, T., and Alahari, S.K. (2008). Nischarin inhibits LIM kinase to regulate cofilin phosphorylation and cell invasion. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3742–3756.
- Diwakar, G., Zhang, D., Jiang, S., and Hornyak, T.J. (2008). Neurofibromin as a regulator of melanocyte development and differentiation. *J. Cell Sci.* *121*, 167–177.
- Doers, M., Musser, M., Nichol, R., Berndt, E., Baker, M., Gomez, T., Zhang, S., Abbeduto, L., and Bhattacharyya, A. (2014). iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem Cells Dev* *23*, 1777–1787.
- Drews, E., Otte, D.-M., and Zimmer, A. (2013). Involvement of the primate specific gene G72 in schizophrenia: From genetic studies to pathomechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *37*, 2410–2417.
- Dulai, S., Briody, J., Schindeler, A., North, K.N., Cowell, C.T., and Little, D.G. (2007). Decreased bone mineral density in neurofibromatosis type 1: results from a pediatric cohort. *J. Pediatr. Orthop.* *27*, 472–475.
- Edwards, D.C., and Gill, G.N. (1999). Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* *274*, 11352–11361.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., and Gill, G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* *1*, 253–259.
- Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P., and Barford, D. (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* *16*, 1876–1887.
- Eldridge, R., Denckla, M.B., Bien, E., Myers, S., Kaiser-Kupfer, M.I., Pikus, A., Schlesinger, S.L., Parry, D.M., Dambrosia, J.M., and Zasloff, M.A. (1989). Neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease). Neurologic and cognitive assessment with sibling controls. *Am. J. Dis. Child.* *1960* *143*, 833–837.
- Eliason, M.J. (1986). Neurofibromatosis: implications for learning and behavior. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* *7*, 175–179.
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 2527–2537.
- Endo, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2007). LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *J. Biol. Chem.* *282*, 13692–13702.
- Endo, M., Yamamoto, H., Setsu, N., Kohashi, K., Takahashi, Y., Ishii, T., Iida, K., Matsumoto, Y., Hakozaki, M., Aoki, M., et al. (2013). Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 450–461.

Bibliographie

- Erickson, H.P. (2000). Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament? *Nat. Cell Biol.* 2, E93–E96.
- Esmailzadeh-Gharehdaghi, E., Banan, M., Farashi, S., Mirabzadeh, A., Farokhashtiani, T., Hosseinkhani, S., Heidari, A., Najmabadi, H., and Ohadi, M. (2011). Support for down-tuning of the calreticulin gene in the process of human evolution. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1770–1773.
- Ethell, I.M., and Yamaguchi, Y. (1999). Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 144, 575–586.
- Eto, M., Karginov, A., and Brautigan, D.L. (1999). A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 16952–16957.
- Evans, D.G., Howard, E., Giblin, C., Clancy, T., Spencer, H., Huson, S.M., and Laloo, F. (2010). Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am. J. Med. Genet. A.* 152A, 327–332.
- Evans, D.G.R., Baser, M.E., McGaughran, J., Sharif, S., Howard, E., and Moran, A. (2002). Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet.* 39, 311–314.
- Fahsold, R., Hoffmeyer, S., Mischung, C., Gille, C., Ehlers, C., Kückceylan, N., Abdel-Nour, M., Gewies, A., Peters, H., Kaufmann, D., et al. (2000). Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 790–818.
- Farokhashtiani, T., Mirabzadeh, A., Olad Nabi, M., Magham, Z.G., Khorshid, H.R.K., Najmabadi, H., and Ohadi, M. (2011). Reversion of the human calreticulin gene promoter to the ancestral type as a result of a novel psychosis-associated mutation. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 541–544.
- Feng, L., Yunoue, S., Tokuo, H., Ozawa, T., Zhang, D., Patrakitkomjorn, S., Ichimura, T., Saya, H., and Araki, N. (2004). PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett.* 557, 275–282.
- Ferner, R.E., Hughes, R.A., and Weinman, J. (1996). Intellectual impairment in neurofibromatosis 1. *J. Neurol. Sci.* 138, 125–133.
- Foletta, V.C., Lim, M.A., Soosairajah, J., Kelly, A.P., Stanley, E.G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J., Bernard, O., et al. (2003). Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J. Cell Biol.* 162, 1089–1098.
- Foletta, V.C., Moussi, N., Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R., and Bernard, O. (2004). LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp. Cell Res.* 294, 392–405.

- Friedl, P., and Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147, 992–1009.
- Friedman, J.M. (1999). Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am. J. Med. Genet.* 89, 1–6.
- Friedman, J.M. (2002). Neurofibromatosis 1: clinical manifestations and diagnostic criteria. *J. Child Neurol.* 17, 548–554; discussion 571–572, 646–651.
- Friedman, J.M., and Riccardi, V.M. (1999). Clinical and epidemiological features. In *Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis*, (Baltimore, MD: Johns Hopkins University press).
- Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., et al. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* 4, 583–591.
- Gamell, C., Schofield, A.V., Suryadinata, R., Sarcevic, B., and Bernard, O. (2013). LIMK2 mediates resistance to chemotherapeutic drugs in neuroblastoma cells through regulation of drug-induced cell cycle arrest. *PloS One* 8, e72850.
- Garg, S., Green, J., Leadbitter, K., Emsley, R., Lehtonen, A., Evans, D.G., and Huson, S.M. (2013). Neurofibromatosis type 1 and autism spectrum disorder. *Pediatrics* 132, e1642–e1648.
- Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 304, 743–746.
- Gill, D.S., Hyman, S.L., Steinberg, A., and North, K.N. (2006). Age-related findings on MRI in neurofibromatosis type 1. *Pediatr. Radiol.* 36, 1048–1056.
- Goh, W.H.S., Khong, P.-L., Leung, C.S.Y., and Wong, V.C.N. (2004). T2-weighted hyperintensities (unidentified bright objects) in children with neurofibromatosis 1: their impact on cognitive function. *J. Child Neurol.* 19, 853–858.
- Gohla, A., Birkenfeld, J., and Bokoch, G.M. (2005). Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* 7, 21–29.
- Goodwin, N.C., Cianchetta, G., Burgoon, H.A., Healy, J., Mabon, R., Strobel, E.D., Allen, J., Wang, S., Hamman, B.D., and Rawlins, D.B. (2015). Discovery of a Type III Inhibitor of LIM Kinase 2 That Binds in a DFG-Out Conformation. *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 53–57.
- Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2005). LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 26533–26542.
- Gottfried, O.N., Viskochil, D.H., Fults, D.W., and Couldwell, W.T. (2006). Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromas and surgical implications. *Neurosurgery* 58, 1–16; discussion 1–16.

Bibliographie

- Govek, E.-E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* *19*, 1–49.
- Goyal, P., Pandey, D., Behring, A., and Siess, W. (2005). Inhibition of nuclear import of LIMK2 in endothelial cells by protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-283. *J. Biol. Chem.* *280*, 27569–27577.
- Goyal, P., Pandey, D., and Siess, W. (2006). Phosphorylation-dependent regulation of unique nuclear and nucleolar localization signals of LIM kinase 2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 25223–25230.
- Grand, R.J., and Owen, D. (1991). The biochemistry of ras p21. *Biochem. J.* *279 (Pt 3)*, 609–631.
- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J.N., Huot, J., and Landry, J. (1997). Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 3)*, 357–368.
- Guilding, C., McNair, K., Stone, T.W., and Morris, B.J. (2007). Restored plasticity in a mouse model of neurofibromatosis type 1 via inhibition of hyperactive ERK and CREB. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 99–105.
- Guo, H., Gu, F., Li, W., Zhang, B., Niu, R., Fu, L., Zhang, N., and Ma, Y. (2009). Reduction of protein kinase C zeta inhibits migration and invasion of human glioblastoma cells. *J. Neurochem.* *109*, 203–213.
- Guo, H.F., The, I., Hannan, F., Bernard, A., and Zhong, Y. (1997). Requirement of *Drosophila* NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science* *276*, 795–798.
- Guo, H.F., Tong, J., Hannan, F., Luo, L., and Zhong, Y. (2000). A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature* *403*, 895–898.
- Gutmann, D.H., and Collins, F.S. (1993). The neurofibromatosis type 1 gene and its protein product, neurofibromin. *Neuron* *10*, 335–343.
- Gutmann, D.H., Aylsworth, A., Carey, J.C., Korf, B., Marks, J., Pyeritz, R.E., Rubenstein, A., and Viskochil, D. (1997). The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* *278*, 51–57.
- Habib, A.A., Gulcher, J.R., Högnason, T., Zheng, L., and Stefánsson, K. (1998). The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene* *16*, 1525–1531.
- Hachon, C., Iannuzzi, S., and Chaix, Y. (2011). Behavioural and cognitive phenotypes in children with neurofibromatosis type 1 (NF1): the link with the neurobiological level. *Brain Dev.* *33*, 52–61.
- Hakimi, M.-A., Speicher, D.W., and Shiekhata, R. (2002). The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis. *J. Biol. Chem.* *277*, 36909–36912.

- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509–514.
- Han, J., Han, L., Tiwari, P., Wen, Z., and Zheng, J.Q. (2007). Spatial targeting of type II protein kinase A to filopodia mediates the regulation of growth cone guidance by cAMP. *J. Cell Biol.* 176, 101–111.
- Hannan, F., Ho, I., Tong, J.J., Zhu, Y., Nurnberg, P., and Zhong, Y. (2006). Effect of neurofibromatosis type I mutations on a novel pathway for adenylyl cyclase activation requiring neurofibromin and Ras. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1087–1098.
- Hawes, J.J., Tuskan, R.G., and Reilly, K.M. (2007). Nf1 expression is dependent on strain background: implications for tumor suppressor haploinsufficiency studies. *Neurogenetics* 8, 121–130.
- Heervä, E., Alanne, M.H., Peltonen, S., Kuorilehto, T., Hentunen, T., Väänänen, K., and Peltonen, J. (2010). Osteoclasts in neurofibromatosis type 1 display enhanced resorption capacity, aberrant morphology, and resistance to serum deprivation. *Bone* 47, 583–590.
- Hegedus, B., Dasgupta, B., Shin, J.E., Emmett, R.J., Hart-Mahon, E.K., Elghazi, L., Bernal-Mizrachi, E., and Gutmann, D.H. (2007). Neurofibromatosis-1 regulates neuronal and glial cell differentiation from neuroglial progenitors in vivo by both cAMP- and Ras-dependent mechanisms. *Cell Stem Cell* 1, 443–457.
- Heng, Y.-W., and Koh, C.-G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1622–1633.
- Heng, Y.-W., Lim, H.-H., Mina, T., Utomo, P., Zhong, S., Lim, C.-T., and Koh, C.-G. (2012). TPPP acts downstream of RhoA-ROCK-LIMK2 to regulate astral microtubule organization and spindle orientation. *J. Cell Sci.* 125, 1579–1590.
- Heroes, E., Lesage, B., Görnemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., and Bollen, M. (2013). The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J.* 280, 584–595.
- Hienola, A., Tumova, S., Kuleskiy, E., and Rauvala, H. (2006). N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *J. Cell Biol.* 174, 569–580.
- Hinman, M.N., Sharma, A., Luo, G., and Lou, H. (2014). Neurofibromatosis type 1 alternative splicing is a key regulator of Ras signaling in neurons. *Mol. Cell. Biol.* 34, 2188–2197.
- Hiraoka, J., Okano, I., Higuchi, O., Yang, N., and Mizuno, K. (1996). Self-association of LIM-kinase 1 mediated by the interaction between an N-terminal LIM domain and a C-terminal kinase domain. *FEBS Lett.* 399, 117–121.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519–526.
- Hlavanda, E., Kovács, J., Oláh, J., Orosz, F., Medzihradsky, K.F., and Ovádi, J. (2002). Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 8657–8664.

Bibliographie

- Ho, I.S., Hannan, F., Guo, H.-F., Hakker, I., and Zhong, Y. (2007). Distinct functional domains of neurofibromatosis type 1 regulate immediate versus long-term memory formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 6852–6857.
- Hofman, K.J., Harris, E.L., Bryan, R.N., and Denckla, M.B. (1994). Neurofibromatosis type 1: the cognitive phenotype. *J. Pediatr.* *124*, S1–S8.
- Hollstein, P.E., and Cichowski, K. (2013). Identifying the Ubiquitin Ligase complex that regulates the NF1 tumor suppressor and Ras. *Cancer Discov.* *3*, 880–893.
- Horita, Y., Ohashi, K., Mukai, M., Inoue, M., and Mizuno, K. (2008). Suppression of the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by knockdown of Slingshot or LIM kinase. *J. Biol. Chem.* *283*, 6013–6021.
- Hotulainen, P., and Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* *189*, 619–629.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* *173*, 383–394.
- Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M.K., and Lappalainen, P. (2005). Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol. Biol. Cell* *16*, 649–664.
- Howe, A.K., and Juliano, R.L. (2000). Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat. Cell Biol.* *2*, 593–600.
- Hsieh, S.H.-K., Ferraro, G.B., and Fournier, A.E. (2006). Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 1006–1015.
- Hsu, F.-F., Lin, T.-Y., Chen, J.-Y., and Shieh, S.-Y. (2010). p53-Mediated transactivation of LIMK2b links actin dynamics to cell cycle checkpoint control. *Oncogene* *29*, 2864–2876.
- Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kharazia, V., Naisbitt, S., Cohen, A.R., Weinberg, R.J., and Sheng, M. (1998). Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J. Cell Biol.* *142*, 139–151.
- Hsueh, Y.P., Roberts, A.M., Volta, M., Sheng, M., and Roberts, R.G. (2001). Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 3764–3770.
- Hu, X., Huang, Q., Yang, X., and Xia, H. (2007). Differential regulation of AMPA receptor trafficking by neurabin-targeted synaptic protein phosphatase-1 in synaptic transmission and long-term depression in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 4674–4686.
- Huffaker, S.J., Chen, J., Nicodemus, K.K., Sambataro, F., Yang, F., Mattay, V., Lipska, B.K., Hyde, T.M., Song, J., Rujescu, D., et al. (2009). A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia. *Nat. Med.* *15*, 509–518.

- Huijbregts, S., Jahja, R., De Sonnevile, L., de Breij, S., and Swaab-Barneveld, H. (2010). Social information processing in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Dev. Med. Child Neurol.* *52*, 620–625.
- Huson, S.M., Harper, P.S., and Compston, D.A. (1988). Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain J. Neurol.* *111 (Pt 6)*, 1355–1381.
- Huynh, D.P., Scoles, D.R., Ho, T.H., Del Bigio, M.R., and Pulst, S.M. (2000). Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Ann. Neurol.* *48*, 737–744.
- Hyman, S.L., Gill, D.S., Shores, E.A., Steinberg, A., Joy, P., Gibikote, S.V., and North, K.N. (2003). Natural history of cognitive deficits and their relationship to MRI T2-hyperintensities in NF1. *Neurology* *60*, 1139–1145.
- Hyman, S.L., Shores, A., and North, K.N. (2005). The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology* *65*, 1037–1044.
- Hyman, S.L., Arthur Shores, E., and North, K.N. (2006). Learning disabilities in children with neurofibromatosis type 1: subtypes, cognitive profile, and attention-deficit-hyperactivity disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* *48*, 973–977.
- Hyman, S.L., Gill, D.S., Shores, E.A., Steinberg, A., and North, K.N. (2007). T2 hyperintensities in children with neurofibromatosis type 1 and their relationship to cognitive functioning. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *78*, 1088–1091.
- Ikebe, C., Ohashi, K., Fujimori, T., Bernard, O., Noda, T., Robertson, E.J., and Mizuno, K. (1997). Mouse LIM-kinase 2 gene: cDNA cloning, genomic organization, and tissue-specific expression of two alternatively initiated transcripts. *Genomics* *46*, 504–508.
- Inclán, Y.F., and Nogales, E. (2001). Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin. *J. Cell Sci.* *114*, 413–422.
- Izawa, I., Tamaki, N., and Saya, H. (1996). Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* *382*, 53–59.
- Jiang, C.J., Weeds, A.G., Khan, S., and Hussey, P.J. (1997). F-actin and G-actin binding are uncoupled by mutation of conserved tyrosine residues in maize actin depolymerizing factor (ZmADF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9973–9978.
- Johnson, E.O., Chang, K.-H., Ghosh, S., Venkatesh, C., Giger, K., Low, P.S., and Shah, K. (2012). LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. *J. Cell Sci.* *125*, 1204–1216.
- Jolly, L.A., Homan, C.C., Jacob, R., Barry, S., and Gecz, J. (2013). The UPF3B gene, implicated in intellectual disability, autism, ADHD and childhood onset schizophrenia regulates neural progenitor cell behaviour and neuronal outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4673–4687.
- Joseph, B., Wallén-Mackenzie, A., Benoit, G., Murata, T., Joodmardi, E., Okret, S., and Perlmann, T. (2003). p57(Kip2) cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15619–15624.

Bibliographie

- Kaji, N., Ohashi, K., Shuin, M., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2003). Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 33450–33455.
- Kaji, N., Muramoto, A., and Mizuno, K. (2008). LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *J. Biol. Chem.* *283*, 4983–4992.
- Kajiwara, Y., Akram, A., Katsel, P., Haroutunian, V., Schmeidler, J., Beecham, G., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., and Buxbaum, J.D. (2009). FE65 binds Teashirt, inhibiting expression of the primate-specific caspase-4. *PloS One* *4*, e5071.
- Kayl, A.E., Moore, B.D., Slopis, J.M., Jackson, E.F., and Leeds, N.E. (2000). Quantitative morphology of the corpus callosum in children with neurofibromatosis and attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Child Neurol.* *15*, 90–96.
- Kedra, D., Carson, E., Weber, G., and Lagercrantz, J. (1998). A sequence highly similar to PNG is located on chromosome 22q12 in intron 15 of the LIMK-2 gene. *Biochem. Mol. Biol. Int.* *44*, 589–594.
- Kim, H.A., Rosenbaum, T., Marchionni, M.A., Ratner, N., and DeClue, J.E. (1995). Schwann cells from neurofibromin deficient mice exhibit activation of p21ras, inhibition of cell proliferation and morphological changes. *Oncogene* *11*, 325–335.
- Kim, J.-E., Ryu, H.J., Kim, M.J., and Kang, T.-C. (2014). LIM kinase-2 induces programmed necrotic neuronal death via dysfunction of DRP1-mediated mitochondrial fission. *Cell Death Differ.* *21*, 1036–1049.
- Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S., and Mizuno, K. (2007). Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *J. Cell Biol.* *177*, 465–476.
- Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2011). Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. *J. Cell Biol.* *193*, 365–380.
- Kluwe, L., Siebert, R., Gesk, S., Friedrich, R.E., Tinschert, S., Kehrer-Sawatzki, H., and Mautner, V.-F. (2004). Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum. Mutat.* *23*, 111–116.
- Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2006). MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *EMBO J.* *25*, 713–726.
- Korf, B.R. (2002). Clinical features and pathobiology of neurofibromatosis 1. *J. Child Neurol.* *17*, 573–577; discussion 602–604, 646–651.
- Korf, B.R., and Rubenstein, A.E. (2005). *Neurofibromatosis: A Handbook for Patients, Families, and Health Care Professionals* (Thieme).

- Koshimizu, U., Takahashi, H., Yoshida, M.C., and Nakamura, T. (1997). cDNA cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the mouse LIM motif-containing kinase gene, *Limk2*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *241*, 243–250.
- Koth, C.W., Cutting, L.E., and Denckla, M.B. (2000). The association of neurofibromatosis type 1 and attention deficit hyperactivity disorder. *Child Neuropsychol. J. Norm. Abnorm. Dev. Child. Adolesc.* *6*, 185–194.
- Kweh, F., Zheng, M., Kurenova, E., Wallace, M., Golubovskaya, V., and Cance, W.G. (2009). Neurofibromin physically interacts with the N-terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol. Carcinog.* *48*, 1005–1017.
- Lammert, M., Friedman, J.M., Kluwe, L., and Mautner, V.F. (2005). Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment. *Arch. Dermatol.* *141*, 71–74.
- Landry, J., and Huot, J. (1999). Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27). *Biochem. Soc. Symp.* *64*, 79–89.
- Lasater, E.A., Li, F., Bessler, W.K., Estes, M.L., Vemula, S., Hingtgen, C.M., Dinauer, M.C., Kapur, R., Conway, S.J., and Ingram, D.A. (2010). Genetic and cellular evidence of vascular inflammation in neurofibromin-deficient mice and humans. *J. Clin. Invest.* *120*, 859–870.
- Lau, N., Feldkamp, M.M., Roncari, L., Loehr, A.H., Shannon, P., Gutmann, D.H., and Guha, A. (2000). Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *59*, 759–767.
- Lazova, R., Gould Rothberg, B.E., Rimm, D., and Scott, G. (2009). The semaphorin 7A receptor Plexin C1 is lost during melanoma metastasis. *Am. J. Dermatopathol.* *31*, 177–181.
- Le, L.Q., Shipman, T., Burns, D.K., and Parada, L.F. (2009). Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas. *Cell Stem Cell* *4*, 453–463.
- Le, L.Q., Liu, C., Shipman, T., Chen, Z., Suter, U., and Parada, L.F. (2011). Susceptible stages in Schwann cells for NF1-associated plexiform neurofibroma development. *Cancer Res.* *71*, 4686–4695.
- Lee, D.Y., Yeh, T.-H., Emmett, R.J., White, C.R., and Gutmann, D.H. (2010). Neurofibromatosis-1 regulates neuroglial progenitor proliferation and glial differentiation in a brain region-specific manner. *Genes Dev.* *24*, 2317–2329.
- Lee, D.Y., Gianino, S.M., and Gutmann, D.H. (2012). Innate neural stem cell heterogeneity determines the patterning of glioma formation in children. *Cancer Cell* *22*, 131–138.
- Lee-Hoeflich, S.T., Causing, C.G., Podkova, M., Zhao, X., Wrana, J.L., and Attisano, L. (2004). Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.* *23*, 4792–4801.

Bibliographie

- Lehotzky, A., Tirián, L., Tökési, N., Lénárt, P., Szabó, B., Kovács, J., and Ovádi, J. (2004). Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival. *J. Cell Sci.* *117*, 6249–6259.
- Lemmon, M.A. (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem. Soc. Trans.* *32*, 707–711.
- Leondaritis, G., Petrikos, L., and Mangoura, D. (2009). Regulation of the Ras-GTPase activating protein neurofibromin by C-tail phosphorylation: implications for protein kinase C/Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway signaling and neuronal differentiation. *J. Neurochem.* *109*, 573–583.
- Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E., and Lim, L. (1998). Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 130–140.
- Levine, T.M., Materek, A., Abel, J., O'Donnell, M., and Cutting, L.E. (2006). Cognitive profile of neurofibromatosis type 1. *Semin. Pediatr. Neurol.* *13*, 8–20.
- Li, F., Downing, B.D., Smiley, L.C., Mund, J.A., Distasi, M.R., Bessler, W.K., Sarchet, K.N., Hinds, D.M., Kamendulis, L.M., Hingtgen, C.M., et al. (2014). Neurofibromin-deficient myeloid cells are critical mediators of aneurysm formation in vivo. *Circulation* *129*, 1213–1224.
- Li, R., Soosairajah, J., Harari, D., Citri, A., Price, J., Ng, H.L., Morton, C.J., Parker, M.W., Yarden, Y., and Bernard, O. (2006). Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homodimerization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1218–1220.
- Li, T., Chalifour, L.E., and Paudel, H.K. (2007). Phosphorylation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent protein kinase 5 during nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* *282*, 6619–6628.
- Li, W., Cui, Y., Kushner, S.A., Brown, R.A.M., Jentsch, J.D., Frankland, P.W., Cannon, T.D., and Silva, A.J. (2005). The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr. Biol. CB* *15*, 1961–1967.
- Li, X., Ke, Q., Li, Y., Liu, F., Zhu, G., and Li, F. (2010). DGCR6L, a novel PAK4 interaction protein, regulates PAK4-mediated migration of human gastric cancer cell via LIMK1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 70–79.
- Li, X., Zhu, Y., Cao, Y., Wang, Q., Du, J., Tian, J., Liang, Y., and Ma, W. (2016). LIM kinase activity is required for microtubule organising centre positioning in mouse oocyte meiosis. *Reprod. Fertil. Dev.*
- Li, Y., Bollag, G., Clark, R., Stevens, J., Conroy, L., Fults, D., Ward, K., Friedman, E., Samowitz, W., and Robertson, M. (1992). Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell* *69*, 275–281.
- Li, Y., O'Connell, P., Breidenbach, H.H., Cawthon, R., Stevens, J., Xu, G., Neil, S., Robertson, M., White, R., and Viskochil, D. (1995). Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics* *25*, 9–18.

- Lim, M.K., Kawamura, T., Ohsawa, Y., Ohtsubo, M., Asakawa, S., Takayanagi, A., and Shimizu, N. (2007). Parkin interacts with LIM Kinase 1 and reduces its cofilin-phosphorylation activity via ubiquitination. *Exp. Cell Res.* *313*, 2858–2874.
- Lin, Y.-L., and Hsueh, Y.-P. (2008). Neurofibromin interacts with CRMP-2 and CRMP-4 in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *369*, 747–752.
- Lin, Y.-L., Lei, Y.-T., Hong, C.-J., and Hsueh, Y.-P. (2007). Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J. Cell Biol.* *177*, 829–841.
- Listernick, R., Charrow, J., and Gutmann, D.H. (1999). Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am. J. Med. Genet.* *89*, 38–44.
- Lopes Ferraz Filho, J.R., Munis, M.P., Soares Souza, A., Sanches, R.A., Goloni-Bertollo, E.M., and Pavarino-Bertelli, E.C. (2008). Unidentified bright objects on brain MRI in children as a diagnostic criterion for neurofibromatosis type 1. *Pediatr. Radiol.* *38*, 305–310.
- Lord, C., Rutter, M., and Le Couteur, A. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* *24*, 659–685.
- Lord, C., Risi, S., Lambrecht, L., Cook, E.H., Leventhal, B.L., DiLavore, P.C., Pickles, A., and Rutter, M. (2000). The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J. Autism Dev. Disord.* *30*, 205–223.
- Lourenço, F.C., Munro, J., Brown, J., Cordero, J., Stefanatos, R., Strathdee, K., Orange, C., Feller, S.M., Sansom, O.J., Vidal, M., et al. (2014). Reduced LIMK2 expression in colorectal cancer reflects its role in limiting stem cell proliferation. *Gut* *63*, 480–493.
- Löwe, J., Li, H., Downing, K.H., and Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *313*, 1045–1057.
- Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 601–635.
- Lush, M.E., Li, Y., Kwon, C.-H., Chen, J., and Parada, L.F. (2008). Neurofibromin is required for barrel formation in the mouse somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 1580–1587.
- Macara, I.G., Lounsbury, K.M., Richards, S.A., McKiernan, C., and Bar-Sagi, D. (1996). The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *10*, 625–630.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* *285*, 895–898.
- Mandelkow, E.M., Lange, G., Jagla, A., Spann, U., and Mandelkow, E. (1988). Dynamics of the microtubule oscillator: role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. *EMBO J.* *7*, 357–365.

Bibliographie

- Manetti, F. (2012). LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med. Res. Rev.* 32, 968–998.
- Mangoura, D., Sun, Y., Li, C., Singh, D., Gutmann, D.H., Flores, A., Ahmed, M., and Vallianatos, G. (2006). Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. *Oncogene* 25, 735–745.
- Mardilovich, K., Baugh, M., Crighton, D., Kowalczyk, D., Gabrielsen, M., Munro, J., Croft, D.R., Lourenco, F., James, D., Kalna, G., et al. (2015). LIM kinase inhibitors disrupt mitotic microtubule organization and impair tumor cell proliferation. *Oncotarget* 6, 38469–38486.
- Marshall, M.S. (1995). Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 1311–1318.
- Martin, G.A., Viskochil, D., Bollag, G., McCabe, P.C., Crosier, W.J., Haubruck, H., Conroy, L., Clark, R., O'Connell, P., and Cawthon, R.M. (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63, 843–849.
- Martin, I., Gauthier, J., D'Amelio, M., Védrine, S., Vourc'h, P., Rouleau, G.A., Persico, A.M., and Andres, C.R. (2007). Transmission disequilibrium study of an oligodendrocyte and myelin glycoprotein gene allele in 431 families with an autistic proband. *Neurosci. Res.* 59, 426–430.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 446–454.
- Mautner, V.-F., Kluwe, L., Thakker, S.D., and Leark, R.A. (2002). Treatment of ADHD in neurofibromatosis type 1. *Dev. Med. Child Neurol.* 44, 164–170.
- Mautner, V.F., Hartmann, M., Kluwe, L., Friedrich, R.E., and Fünsterer, C. (2006). MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* 48, 160–165.
- Mautner, V.-F., Kluwe, L., Friedrich, R.E., Roehl, A.C., Bammert, S., Högel, J., Spöri, H., Cooper, D.N., and Kehrer-Sawatzki, H. (2010). Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 NF1 deletions. *J. Med. Genet.* 47, 623–630.
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L., and Baltimore, D. (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73, 629–630.
- Mazzocco, M.M.M., Turner, J.E., Denckla, M.B., Hofman, K.J., Scanlon, D.C., and Vellutino, F.R. (1995). Language and reading deficits associated with Neurofibromatosis Type 1: Evidence for a not-so-nonverbal learning disability. *Dev. Neuropsychol.* 11, 503–522.
- McGillicuddy, L.T., Fromm, J.A., Hollstein, P.E., Kubek, S., Beroukhim, R., De Raedt, T., Johnson, B.W., Williams, S.M.G., Nghiemphu, P., Liau, L.M., et al. (2009). Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer Cell* 16, 44–54.

- Meberg, P.J., Ono, S., Minamide, L.S., Takahashi, M., and Bamburg, J.R. (1998). Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil. Cytoskeleton* 39, 172–190.
- Meng, Y., Takahashi, H., Meng, J., Zhang, Y., Lu, G., Asrar, S., Nakamura, T., and Jia, Z. (2004). Regulation of ADF/cofilin phosphorylation and synaptic function by LIM-kinase. *Neuropharmacology* 47, 746–754.
- Meyer, G., Kim, B., van Golen, C., and Feldman, E.L. (2005). Cofilin activity during insulin-like growth factor I-stimulated neuroblastoma cell motility. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 461–470.
- Mishima, T., Naotsuka, M., Horita, Y., Sato, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2010). LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 577–581.
- Misra, U.K., Deedwania, R., and Pizzo, S.V. (2005). Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J. Biol. Chem.* 280, 26278–26286.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242.
- Mizuno, K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* 25, 457–469.
- Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuma, K., Miyata, T., and Nakamura, T. (1994). Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* 9, 1605–1612.
- Monroe, J.D., and Heathcote, R.D. (2013). Protein phosphatases regulate the growth of developing neurites. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 31, 250–257.
- Moon, A., and Drubin, D.G. (1995). The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 6, 1423–1431.
- Moore, B.D., Slopis, J.M., Schomer, D., Jackson, E.F., and Levy, B.M. (1996). Neuropsychological significance of areas of high signal intensity on brain MRIs of children with neurofibromatosis. *Neurology* 46, 1660–1668.
- Moore, B.D., Slopis, J.M., Jackson, E.F., De Winter, A.E., and Leeds, N.E. (2000). Brain volume in children with neurofibromatosis type 1: relation to neuropsychological status. *Neurology* 54, 914–920.
- Mori, T., Okano, I., Mizuno, K., Tohyama, M., and Wanaka, A. (1997). Comparison of tissue distribution of two novel serine/threonine kinase genes containing the LIM motif (LIMK-1 and LIMK-2) in the developing rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 45, 247–254.
- Morishita, W., Connor, J.H., Xia, H., Quinlan, E.M., Shenolikar, S., and Malenka, R.C. (2001). Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron* 32, 1133–1148.

Bibliographie

- Moriyama, K., and Yahara, I. (1999). Two activities of cofilin, severing and accelerating directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations around the actin-binding helix. *EMBO J.* *18*, 6752–6761.
- Mountzios, G., Terpos, E., and Dimopoulos, M.-A. (2008). Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* *34*, 175–182.
- Munton, R.P., Vizi, S., and Mansuy, I.M. (2004). The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett.* *567*, 121–128.
- Nadella, K.S., Saji, M., Jacob, N.K., Pavel, E., Ringel, M.D., and Kirschner, L.S. (2009). Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1. *EMBO Rep.* *10*, 599–605.
- Nadler, Y., Camp, R.L., Schwartz, C., Rimm, D.L., Kluger, H.M., and Kluger, Y. (2008). Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 4455–4462.
- Nagata, K., Ohashi, K., Yang, N., and Mizuno, K. (1999). The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem. J.* *343 Pt 1*, 99–105.
- Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Goto, K., Chiba, S., Mori, R., Nishita, M., Ohashi, K., Kousaka, K., Iwamatsu, A., Niwa, R., et al. (2004). A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J. Cell Biol.* *165*, 465–471.
- NIH (1988). Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch. Neurol.* *45*, 575–578.
- Nishita, M., Aizawa, H., and Mizuno, K. (2002). Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 774–783.
- Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2005). Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J. Cell Biol.* *171*, 349–359.
- Nishiya, N., Sabe, H., Nose, K., and Shibamura, M. (1998). The LIM domains of hic-5 protein recognize specific DNA fragments in a zinc-dependent manner in vitro. *Nucleic Acids Res.* *26*, 4267–4273.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., and Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* *108*, 233–246.
- Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* *391*, 199–203.
- Noll, R.B., Reiter-Purtill, J., Moore, B.D., Schorry, E.K., Lovell, A.M., Vannatta, K., and Gerhardt, C.A. (2007). Social, emotional, and behavioral functioning of children with NF1. *Am. J. Med. Genet. A.* *143A*, 2261–2273.

- Nomoto, S., Tatematsu, Y., Takahashi, T., and Osada, H. (1999). Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression. *Gene* 236, 259–271.
- Nordlund, M., Gu, X., Shipley, M.T., and Ratner, N. (1993). Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 1588–1600.
- North, K. (2000). Neurofibromatosis type 1. *Am. J. Med. Genet.* 97, 119–127.
- North, K., Joy, P., Yuille, D., Cocks, N., Mobbs, E., Hutchins, P., McHugh, K., and de Silva, M. (1994). Specific learning disability in children with neurofibromatosis type 1: significance of MRI abnormalities. *Neurology* 44, 878–883.
- North, K., Joy, P., Yuille, D., Cocks, N., and Hutchins, P. (1995). Cognitive function and academic performance in children with neurofibromatosis type 1. *Dev. Med. Child Neurol.* 37, 427–436.
- North, K., Hyman, S., and Barton, B. (2002). Cognitive deficits in neurofibromatosis 1. *J. Child Neurol.* 17, 605–612; discussion 627–629, 646–651.
- Nunoue, K., Ohashi, K., Okano, I., and Mizuno, K. (1995). LIMK-1 and LIMK-2, two members of a LIM motif-containing protein kinase family. *Oncogene* 11, 701–710.
- Nürnberg, A., Kitzing, T., and Grosse, R. (2011). Nucleating actin for invasion. *Nat. Rev. Cancer* 11, 177–187.
- Oderich, G.S., Sullivan, T.M., Bower, T.C., Gloviczki, P., Miller, D.V., Babovic-Vuksanovic, D., Macedo, T.A., and Stanson, A. (2007). Vascular abnormalities in patients with neurofibromatosis syndrome type I: clinical spectrum, management, and results. *J. Vasc. Surg.* 46, 475–484.
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 3577–3582.
- Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kondo, H., Kiuchi, T., Sato, M., and Mizuno, K. (2011). LIM kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 286, 36340–36351.
- Ohki, S. ya, Eto, M., Shimizu, M., Takada, R., Brautigan, D.L., and Kainosho, M. (2003). Distinctive solution conformation of phosphatase inhibitor CPI-17 substituted with aspartate at the phosphorylation-site threonine residue. *J. Mol. Biol.* 326, 1539–1547.
- Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int. Rev. Cytol.* 258, 1–82.
- Ono, S., McGough, A., Pope, B.J., Tolbert, V.T., Bui, A., Pohl, J., Benian, G.M., Gernert, K.M., and Weeds, A.G. (2001). The C-terminal tail of UNC-60B (actin depolymerizing factor/cofilin) is critical for maintaining its stable association with F-actin and is implicated in the second actin-binding site. *J. Biol. Chem.* 276, 5952–5958.

Bibliographie

- Osada, H., Hasada, K., Inazawa, J., Uchida, K., Ueda, R., Takahashi, T., and Takahashi, T. (1996). Subcellular localization and protein interaction of the human LIMK2 gene expressing alternative transcripts with tissue-specific regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *229*, 582–589.
- Oser, M., and Condeelis, J. (2009). The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J. Cell. Biochem.* *108*, 1252–1262.
- Ozawa, T., Araki, N., Yunoue, S., Tokuo, H., Feng, L., Patrakitkomjorn, S., Hara, T., Ichikawa, Y., Matsumoto, K., Fujii, K., et al. (2005). 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.* *280*, 39524–39533.
- Pak, C.W., Flynn, K.C., and Bamberg, J.R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 136–147.
- Pandey, D., Goyal, P., Bamberg, J.R., and Siess, W. (2006). Regulation of LIM-kinase 1 and cofilin in thrombin-stimulated platelets. *Blood* *107*, 575–583.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* *292*, 1502–1506.
- Papadopoulou, N., Charalampopoulos, I., Alevizopoulos, K., Gravanis, A., and Stournaras, C. (2008). Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp. Cell Res.* *314*, 3162–3174.
- Pasmant, E., Sabbagh, A., Spurlock, G., Laurendeau, I., Grillo, E., Hamel, M.-J., Martin, L., Barbarot, S., Leheup, B., Rodriguez, D., et al. (2010). NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum. Mutat.* *31*, E1506–E1518.
- Patrakitkomjorn, S., Kobayashi, D., Morikawa, T., Wilson, M.M., Tsubota, N., Irie, A., Ozawa, T., Aoki, M., Arimura, N., Kaibuchi, K., et al. (2008). Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. *J. Biol. Chem.* *283*, 9399–9413.
- Pellegrin, S., and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *J. Cell Sci.* *120*, 3491–3499.
- Perlmann, T., and Wallén-Mackenzie, A. (2004). Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res.* *318*, 45–52.
- Perou, R., Bitsko, R.H., Blumberg, S.J., Pastor, P., Ghandour, R.M., Gfroerer, J.C., Hedden, S.L., Crosby, A.E., Visser, S.N., Schieve, L.A., et al. (2013). Mental health surveillance among children--United States, 2005-2011. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC* *2002 62 Suppl 2*, 1–35.
- Perrimon, N., and Bernfield, M. (2000). Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* *404*, 725–728.

- Petrilli, A., Copik, A., Posadas, M., Chang, L.-S., Welling, D.B., Giovannini, M., and Fernández-Valle, C. (2014). LIM domain kinases as potential therapeutic targets for neurofibromatosis type 2. *Oncogene* *33*, 3571–3582.
- Phillips, S.E., Sha, B., Topalof, L., Xie, Z., Alb, J.G., Klenchin, V.A., Swigart, P., Cockcroft, S., Martin, T.F., Luo, M., et al. (1999). Yeast Sec14p deficient in phosphatidylinositol transfer activity is functional in vivo. *Mol. Cell* *4*, 187–197.
- Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* *103*, 2747–2754.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453–465.
- Pope, B.J., Gonsior, S.M., Yeoh, S., McGough, A., and Weeds, A.G. (2000). Uncoupling actin filament fragmentation by cofilin from increased subunit turnover. *J. Mol. Biol.* *298*, 649–661.
- Po'uha, S.T., Shum, M.S.Y., Goebel, A., Bernard, O., and Kavallaris, M. (2010). LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* *29*, 597–607.
- Poyhonen, M., Leisti, E.L., Kytölä, S., and Leisti, J. (1997). Hereditary spinal neurofibromatosis: a rare form of NF1? *J. Med. Genet.* *34*, 184–187.
- Pröschel, C., Blouin, M.J., Gutowski, N.J., Ludwig, R., and Noble, M. (1995). Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro. *Oncogene* *11*, 1271–1281.
- Raaum, R.L., Sterner, K.N., Noviello, C.M., Stewart, C.-B., and Disotell, T.R. (2005). Catarrhine primate divergence dates estimated from complete mitochondrial genomes: concordance with fossil and nuclear DNA evidence. *J. Hum. Evol.* *48*, 237–257.
- Rad, E., and Tee, A.R. (2016). Neurofibromatosis Type 1: fundamental insights into cell signalling and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Raiker, S.J., Lee, H., Baldwin, K.T., Duan, Y., Shrager, P., and Giger, R.J. (2010). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 12432–12445.
- Ramakers, G.J.A. (2002). Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci.* *25*, 191–199.
- Rasmussen, S.A., Yang, Q., and Friedman, J.M. (2001). Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 1110–1118.
- Ratner, N., and Miller, S.J. (2015). A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 290–301.

Bibliographie

- Rea, D., Brandsema, J.F., Armstrong, D., Parkin, P.C., deVeber, G., MacGregor, D., Logan, W.J., and Askalan, R. (2009). Cerebral arteriopathy in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatrics* *124*, e476–e483.
- Reilly, K.M., Loisel, D.A., Bronson, R.T., McLaughlin, M.E., and Jacks, T. (2000). Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nat. Genet.* *26*, 109–113.
- Reilly, K.M., Tuskan, R.G., Christy, E., Loisel, D.A., Ledger, J., Bronson, R.T., Smith, C.D., Tsang, S., Munroe, D.J., and Jacks, T. (2004). Susceptibility to astrocytoma in mice mutant for Nf1 and Trp53 is linked to chromosome 11 and subject to epigenetic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13008–13013.
- Renner, M., Specht, C.G., and Triller, A. (2008). Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* *18*, 532–540.
- Rezazadeh, M., Gharesouran, J., Mirabzadeh, A., Khorram Khorshid, H.R., Biglarian, A., and Ohadi, M. (2015a). A primate-specific functional GTTT-repeat in the core promoter of CYTH4 is linked to bipolar disorder in human. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *56*, 161–167.
- Rezazadeh, M., Gharesouran, J., Movafagh, A., Taheri, M., Darvish, H., Emamalizadeh, B., Shahmohammadibeni, N., Khorram Khorshid, H.R., Behmanesh, M., Sahraian, M.A., et al. (2015b). Dominant and Protective Role of the CYTH4 Primate-Specific GTTT-Repeat Longer Alleles Against Neurodegeneration. *J. Mol. Neurosci.* *MN 56*, 593–596.
- Rizvi, T.A., Akunuru, S., de Courten-Myers, G., Switzer, R.C., Nordlund, M.L., and Ratner, N. (1999). Region-specific astrogliosis in brains of mice heterozygous for mutations in the neurofibromatosis type 1 (Nf1) tumor suppressor. *Brain Res.* *816*, 111–123.
- Rogemond, V., Auger, C., Giraudon, P., Becchi, M., Auvergnon, N., Belin, M.-F., Honnorat, J., and Moradi-Améli, M. (2008). Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition. *J. Biol. Chem.* *283*, 14751–14761.
- Rosser, T., and Packer, R.J. (2002). Intracranial neoplasms in children with neurofibromatosis 1. *J. Child Neurol.* *17*, 630–637; discussion 646–651.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* *15*, 2169–2177.
- Ruggieri, M., and Huson, S.M. (2001). The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses. *Neurology* *56*, 1433–1443.
- Rutkowski, J.L., Wu, K., Gutmann, D.H., Boyer, P.J., and Legius, E. (2000). Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1059–1066.

- Sacchetti, P., Carpentier, R., Ségard, P., Olivé-Cren, C., and Lefebvre, P. (2006). Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res.* *34*, 5515–5527.
- Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 737–749.
- Sahai, E., Olson, M.F., and Marshall, C.J. (2001). Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J.* *20*, 755–766.
- Said, S.M., Yeh, T.L., Greenwood, R.S., Whitt, J.K., Tupler, L.A., and Krishnan, K.R. (1996). MRI morphometric analysis and neuropsychological function in patients with neurofibromatosis. *Neuroreport* *7*, 1941–1944.
- Saito, K., Tautz, L., and Mustelin, T. (2007). The lipid-binding SEC14 domain. *Biochim. Biophys. Acta* *1771*, 719–726.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Wiesmüller, L., Kabsch, W., Stege, P., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1998). Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *EMBO J.* *17*, 4313–4327.
- Schlager, M.A., and Hoogenraad, C.C. (2009). Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol. Brain* *2*, 25.
- Schlessinger, J., Lax, I., and Lemmon, M. (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* *83*, 357–360.
- Schofield, A.V., Steel, R., and Bernard, O. (2012). Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) protein controls microtubule dynamics in a novel signaling pathway that regulates cell migration. *J. Biol. Chem.* *287*, 43620–43629.
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., and Greenberg, M.E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* *439*, 283–289.
- Schrimsher, G.W., Billingsley, R.L., Slopis, J.M., and Moore, B.D. (2003). Visual-spatial performance deficits in children with neurofibromatosis type-1. *Am. J. Med. Genet. A.* *120A*, 326–330.
- Scott, R.W., and Olson, M.F. (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *85*, 555–568.
- Scott, G.A., McClelland, L.A., Fricke, A.F., and Fender, A. (2009). Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 954–963.
- Scott, R.W., Hooper, S., Crighton, D., Li, A., König, I., Munro, J., Trivier, E., Wickman, G., Morin, P., Croft, D.R., et al. (2010). LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J. Cell Biol.* *191*, 169–185.

Bibliographie

- Seizinger, B.R., Rouleau, G.A., Ozelius, L.J., Lane, A.H., Faryniarz, A.G., Chao, M.V., Huson, S., Korf, B.R., Parry, D.M., and Pericak-Vance, M.A. (1987). Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell* 49, 589–594.
- Sept, D., and McCammon, J.A. (2001). Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys. J.* 81, 667–674.
- Serra, E., Rosenbaum, T., Winner, U., Aledo, R., Ars, E., Estivill, X., Lenard, H.G., and Lázaro, C. (2000). Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum. Mol. Genet.* 9, 3055–3064.
- Shea, K.F., Wells, C.M., Garner, A.P., and Jones, G.E. (2008). ROCK1 and LIMK2 interact in spread but not blebbing cancer cells. *PLoS One* 3, e3398.
- Sheela, S., Riccardi, V.M., and Ratner, N. (1990). Angiogenic and invasive properties of neurofibroma Schwann cells. *J. Cell Biol.* 111, 645–653.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847.
- Shiohira, H., Kitaoka, A., Enjoji, M., Uno, T., and Nakashima, M. (2012). Am80 induces neuronal differentiation via increased tropomyosin-related kinase B expression in a human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 33, 291–297.
- Siddoway, B.A., Altimimi, H.F., Hou, H., Petralia, R.S., Xu, B., Stellwagen, D., and Xia, H. (2013). An essential role for inhibitor-2 regulation of protein phosphatase-1 in synaptic scaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 11206–11211.
- Silva, A.J., Frankland, P.W., Marowitz, Z., Friedman, E., Laszlo, G.S., Cioffi, D., Jacks, T., Bourchouladze, R., and Lazlo, G. (1997). A mouse model for the learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type I. *Nat. Genet.* 15, 281–284.
- Simmons, G.W., Pong, W.W., Emmett, R.J., White, C.R., Gianino, S.M., Rodriguez, F.J., and Gutmann, D.H. (2011). Neurofibromatosis-1 heterozygosity increases microglia in a spatially and temporally restricted pattern relevant to mouse optic glioma formation and growth. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 51–62.
- Skloot, R. (2010). *La vie immortelle d'Henrietta Lacks* (le Grand livre du mois).
- Song, K.S., Li Shengwen, null, Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M., and Lisanti, M.P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* 271, 9690–9697.
- Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O. 'neil, Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamburg, J.R., and Bernard, O. (2005). Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J.* 24, 473–486.

- Srivastava, A.K., and Schwartz, C.E. (2014). Intellectual disability and autism spectrum disorders: causal genes and molecular mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *46 Pt 2*, 161–174.
- Stansfield, B.K., Bessler, W.K., Mali, R., Mund, J.A., Downing, B., Li, F., Sarchet, K.N., DiStasi, M.R., Conway, S.J., Kapur, R., et al. (2013). Heterozygous inactivation of the *Nf1* gene in myeloid cells enhances neointima formation via a rosuvastatin-sensitive cellular pathway. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 977–988.
- Starinsky-Elbaz, S., Faigenbloom, L., Friedman, E., Stein, R., and Kloog, Y. (2009). The pre-GAP-related domain of neurofibromin regulates cell migration through the LIM kinase/cofilin pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* *42*, 278–287.
- Stenson, P.D., Ball, E., Howells, K., Phillips, A., Mort, M., and Cooper, D.N. (2008). Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive central mutation database. *J. Med. Genet.* *45*, 124–126.
- Stevenson, D.A., Moyer-Mileur, L.J., Murray, M., Slater, H., Sheng, X., Carey, J.C., Dube, B., and Viskochil, D.H. (2007). Bone mineral density in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *J. Pediatr.* *150*, 83–88.
- Stork, P.J.S. (2002). ERK signaling: duration, duration, duration. *Cell Cycle Georget. Tex* *1*, 315–317.
- Stowe, I.B., Mercado, E.L., Stowe, T.R., Bell, E.L., Oses-Prieto, J.A., Hernández, H., Burlingame, A.L., and McCormick, F. (2012). A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes Dev.* *26*, 1421–1426.
- Stulberg, D.L., Clark, N., and Tovey, D. (2003). Common hyperpigmentation disorders in adults: Part I. Diagnostic approach, café au lait macules, diffuse hyperpigmentation, sun exposure, and phototoxic reactions. *Am. Fam. Physician* *68*, 1955–1960.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y., and Nakamura, T. (1999). Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* *147*, 1519–1532.
- Sumi, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2001a). Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *276*, 670–676.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A., and Nakamura, T. (2001b). Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J. Biol. Chem.* *276*, 23092–23096.
- Sumi, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2002). Mitosis-dependent phosphorylation and activation of LIM-kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 1315–1320.

Bibliographie

- Sumi, T., Hashigasako, A., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2006). Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition. *Exp. Cell Res.* *312*, 1021–1030.
- Szudek, J., Evans, D.G., and Friedman, J.M. (2003). Patterns of associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF1). *Hum. Genet.* *112*, 289–297.
- Takemura, M., Mishima, T., Wang, Y., Kasahara, J., Fukunaga, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2009). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* *284*, 28554–28562.
- Tastet, J. (2012). Etude des gènes LIMK2 et RNF135, impliqués dans les mécanismes moléculaires de la neurofibromatose de type 1, dans l'autisme et la déficience mentale.
- Tastet, J., Vourc'h, P., Laumonnier, F., Vallée, B., Michelle, C., Duittoz, A., Bénédicti, H., and Andres, C.R. (2012). LIMK2d, a truncated isoform of Lim kinase 2 regulates neurite growth in absence of the LIM kinase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *420*, 247–252.
- Tastet, J., Decalonne, L., Marouillat, S., Malvy, J., Thépault, R.-A., Toutain, A., Paubel, A., Tabagh, R., Bénédicti, H., Laumonnier, F., et al. (2015). Mutation screening of the ubiquitin ligase gene RNF135 in French patients with autism. *Psychiatr. Genet.* *25*, 263–267.
- Te Velthuis, A.J.W., Isogai, T., Gerrits, L., and Bagowski, C.P. (2007). Insights into the molecular evolution of the PDZ/LIM family and identification of a novel conserved protein motif. *PLoS One* *2*, e189.
- The, I., Hannigan, G.E., Cowley, G.S., Reginald, S., Zhong, Y., Gusella, J.F., Hariharan, I.K., and Bernards, A. (1997). Rescue of a *Drosophila* NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* *276*, 791–794.
- Thirone, A.C.P., Speight, P., Zulys, M., Rotstein, O.D., Szász, K., Pedersen, S.F., and Kapus, A. (2009). Hyperosmotic stress induces Rho/Rho kinase/LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation in tubular cells: key role in the osmotically triggered F-actin response. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C463–C475.
- Tirián, L., Hlavanda, E., Oláh, J., Horváth, I., Orosz, F., Szabó, B., Kovács, J., Szabad, J., and Ovádi, J. (2003). TPPP/p25 promotes tubulin assemblies and blocks mitotic spindle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13976–13981.
- Todorovski, Z., Asrar, S., Liu, J., Saw, N.M.N., Joshi, K., Cortez, M.A., Snead, O.C., Xie, W., and Jia, Z. (2015). LIMK1 regulates long-term memory and synaptic plasticity via the transcriptional factor CREB. *Mol. Cell. Biol.*
- Tokuo, H., Yunoue, S., Feng, L., Kimoto, M., Tsuji, H., Ono, T., Saya, H., and Araki, N. (2001). Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *FEBS Lett.* *494*, 48–53.

- Tomiyoshi, G., Horita, Y., Nishita, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2004). Caspase-mediated cleavage and activation of LIM-kinase 1 and its role in apoptotic membrane blebbing. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *9*, 591–600.
- Tong, J., Hannan, F., Zhu, Y., Bernardis, A., and Zhong, Y. (2002). Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nat. Neurosci.* *5*, 95–96.
- Trovó-Marqui, A.B., and Tajara, E.H. (2006). Neurofibromin: a general outlook. *Clin. Genet.* *70*, 1–13.
- 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. (2005). The ubiquitin ligase Rnf6 regulates local LIM kinase 1 levels in axonal growth cones. *Genes Dev.* *19*, 2307–2319.
- Tuszynski, J.A., Carpenter, E.J., Huzil, J.T., Malinski, W., Luchko, T., and Luduena, R.F. (2006). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Int. J. Dev. Biol.* *50*, 341–358.
- Tzivion, G., and Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *277*, 3061–3064.
- Uchida, T., Matozaki, T., Suzuki, T., Matsuda, K., Wada, K., Nakano, O., Konda, Y., Nishisaki, H., Nagao, M., and Sakamoto, C. (1992). Expression of two types of neurofibromatosis type 1 gene transcripts in gastric cancers and comparison of GAP activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *187*, 332–339.
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., et al. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *10*, 165–179.
- Upadhyaya, M., Osborn, M.J., Maynard, J., Kim, M.R., Tamanoi, F., and Cooper, D.N. (1997). Mutational and functional analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.* *99*, 88–92.
- Upadhyaya, M., Huson, S.M., Davies, M., Thomas, N., Chuzhanova, N., Giovannini, S., Evans, D.G., Howard, E., Kerr, B., Griffiths, S., et al. (2007). An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 140–151.
- Vallée, B., Doudeau, M., Godin, F., Gombault, A., Tchalikian, A., de Tauzia, M.-L., and Bénédicti, H. (2012). Nf1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways. *PLoS One* *7*, e47283.
- Vandenbroucke, I., Van Oostveldt, P., Coene, E., De Paepe, A., and Messiaen, L. (2004). Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett.* *560*, 98–102.

Bibliographie

- Van Maldergem, L., Hou, Q., Kalscheuer, V., Rio, M., Doco-Fenzy, M., Medeira, A., de Brouwer, A., Cabrol, C., Haas, S., Cacciagli, P., et al. (2013). Loss of function of KIAA2022 causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth. *Hum Mol Genet* 22, 3306–3314.
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerkhove, J., and Ampe, C. (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 649–667.
- Vartiainen, M.K., Mustonen, T., Mattila, P.K., Ojala, P.J., Thesleff, I., Partanen, J., and Lappalainen, P. (2002). The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13, 183–194.
- Venturin, M., Guarnieri, P., Natacci, F., Stabile, M., Tenconi, R., Clementi, M., Hernandez, C., Thompson, P., Upadhyaya, M., Larizza, L., et al. (2004). Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2. *J. Med. Genet.* 41, 35–41.
- Venturin, M., Moncini, S., Villa, V., Russo, S., Bonati, M.T., Larizza, L., and Riva, P. (2006). Mutations and novel polymorphisms in coding regions and UTRs of CDK5R1 and OMG genes in patients with non-syndromic mental retardation. *Neurogenetics* 7, 59–66.
- Viskochil, D. (2002). Genetics of neurofibromatosis 1 and the NF1 gene. *J. Child Neurol.* 17, 562–570; discussion 571–572, 646–651.
- Viskochil, D., Buchberg, A.M., Xu, G., Cawthon, R.M., Stevens, J., Wolff, R.K., Culver, M., Carey, J.C., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1990). Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62, 187–192.
- Vlachos, P., and Joseph, B. (2009). The Cdk inhibitor p57(Kip2) controls LIM-kinase 1 activity and regulates actin cytoskeleton dynamics. *Oncogene* 28, 4175–4188.
- Voss, A.K., Britto, J.M., Dixon, M.P., Sheikh, B.N., Collin, C., Tan, S.-S., and Thomas, T. (2008). C3G regulates cortical neuron migration, preplate splitting and radial glial cell attachment. *Dev. Camb. Engl.* 135, 2139–2149.
- Vourc'h, P., Martin, I., Marouillat, S., Adrien, J.L., Barthélémy, C., Moraine, C., Müh, J.P., and Andres, C. (2003). Molecular analysis of the oligodendrocyte myelin glycoprotein gene in autistic disorder. *Neurosci. Lett.* 338, 115–118.
- Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., and Mitchell, A.L. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249, 181–186.
- Wang, H.-F., Shih, Y.-T., Chen, C.-Y., Chao, H.-W., Lee, M.-J., and Hsueh, Y.-P. (2011). Valosin-containing protein and neurofibromin interact to regulate dendritic spine density. *J. Clin. Invest.* 121, 4820–4837.

- Wang, J.Y., Frenzel, K.E., Wen, D., and Falls, D.L. (1998). Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J. Biol. Chem.* *273*, 20525–20534.
- Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L., and He, Z. (2002). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* *417*, 941–944.
- Wang, W., Mouneimne, G., Sidani, M., Wyckoff, J., Chen, X., Makris, A., Goswami, S., Bresnick, A.R., and Condeelis, J.S. (2006). The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J. Cell Biol.* *173*, 395–404.
- Wang, W., Wyckoff, J.B., Goswami, S., Wang, Y., Sidani, M., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2007). Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors. *Cancer Res.* *67*, 3505–3511.
- Wang, Y., Kuramitsu, Y., Kitagawa, T., Baron, B., Yoshino, S., Maehara, S.-I., Maehara, Y., Oka, M., and Nakamura, K. (2015). Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. *Cancer Lett.* *360*, 171–176.
- Warrington, N.M., Gianino, S.M., Jackson, E., Goldhoff, P., Garbow, J.R., Piwnica-Worms, D., Gutmann, D.H., and Rubin, J.B. (2010). Cyclic AMP suppression is sufficient to induce gliomagenesis in a mouse model of neurofibromatosis-1. *Cancer Res.* *70*, 5717–5727.
- Welti, S., Fraterman, S., D'Angelo, I., Wilm, M., and Scheffzek, K. (2007). The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J. Mol. Biol.* *366*, 551–562.
- Williams, V.C., Lucas, J., Babcock, M.A., Gutmann, D.H., Korf, B., and Maria, B.L. (2009). Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics* *123*, 124–133.
- Wu, H., Zheng, Y., and Wang, Z.-X. (2003). Evaluation of the catalytic mechanism of the p21-activated protein kinase PAK2. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 1129–1139.
- Xu, G.F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., and White, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* *62*, 599–608.
- Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 642–652.
- Yang, N., and Mizuno, K. (1999). Nuclear export of LIM-kinase 1, mediated by two leucine-rich nuclear-export signals within the PDZ domain. *Biochem. J.* *338 (Pt 3)*, 793–798.
- Yang, E.J., Yoon, J.-H., Min, D.S., and Chung, K.C. (2004a). LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 8903–8910.
- Yang, N., Higuchi, O., and Mizuno, K. (1998a). Cytoplasmic localization of LIM-kinase 1 is directed by a short sequence within the PDZ domain. *Exp. Cell Res.* *241*, 242–252.

Bibliographie

- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998b). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809–812.
- Yang, X., Yu, K., Hao, Y., Li, D., Stewart, R., Insogna, K.L., and Xu, T. (2004b). LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nat. Cell Biol.* 6, 609–617.
- Yin, J.C., and Tully, T. (1996). CREB and the formation of long-term memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 264–268.
- Yokoo, T., Toyoshima, H., Miura, M., Wang, Y., Iida, K.T., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Gotoda, T., Nishimori, S., et al. (2003). p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 52919–52923.
- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., and Itoh, K. (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7247–7252.
- Yunoue, S., Tokuo, H., Fukunaga, K., Feng, L., Ozawa, T., Nishi, T., Kikuchi, A., Hattori, S., Kuratsu, J., Saya, H., et al. (2003). Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras. *J. Biol. Chem.* 278, 26958–26969.
- Zebda, N., Bernard, O., Bailly, M., Welti, S., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2000). Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J. Cell Biol.* 151, 1119–1128.
- Zhou, Y., Won, J., Karlsson, M.G., Zhou, M., Rogerson, T., Balaji, J., Neve, R., Poirazi, P., and Silva, A.J. (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat. Neurosci.* 12, 1438–1443.
- Zhu, Q., Ge, D., Maia, J.M., Zhu, M., Petrovski, S., Dickson, S.P., Heinzen, E.L., Shianna, K.V., and Goldstein, D.B. (2011). A genome-wide comparison of the functional properties of rare and common genetic variants in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 458–468.
- Zhu, Y., Romero, M.I., Ghosh, P., Ye, Z., Charnay, P., Rushing, E.J., Marth, J.D., and Parada, L.F. (2001). Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev.* 15, 859–876.
- Zhu, Y., Ghosh, P., Charnay, P., Burns, D.K., and Parada, L.F. (2002). Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 296, 920–922.
- Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D.K., Mason, R.P., Messing, A., and Parada, L.F. (2005a). Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* 8, 119–130.
- Zhu, Y., Harada, T., Liu, L., Lush, M.E., Guignard, F., Harada, C., Burns, D.K., Bajenaru, M.L., Gutmann, D.H., and Parada, L.F. (2005b). Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation. *Dev. Camb. Engl.* 132, 5577–5588.

Zöller, M.E., Rembeck, B., and Bäckman, L. (1997). Neuropsychological deficits in adults with neurofibromatosis type 1. *Acta Neurol. Scand.* 95, 225–232.

Zou, C., Smith, K.D., Liu, J., Lahat, G., Myers, S., Wang, W.-L., Zhang, W., McCutcheon, I.E., Slopis, J.M., Lazar, A.J., et al. (2009). Clinical, pathological, and molecular variables predictive of malignant peripheral nerve sheath tumor outcome. *Ann. Surg.* 249, 1014–1022.



Hélène CUBEROS

Les LIM kinases dans la neurofibromatose de type 1 : Caractérisation cellulaire et moléculaire de LIMK2-1, une isoforme associée à la déficience intellectuelle

LIMK1 et LIMK2 sont des sérines/thréonine kinases capables de phosphoryler et d'inactiver la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine. Elles sont régulées négativement par la neurofibromine, responsable de la neurofibromatose de type 1, et pourraient être impliquées à la fois dans les aspects tumoraux et cognitifs de cette maladie par leur rôle dans la dynamique de l'actine.

Nous avons étudié l'isoforme LIMK2-1 de LIMK2, spécifique des hominidés et précédemment associée à la déficience intellectuelle. Cette isoforme possède un domaine kinase tronqué et un domaine inhibiteur de la phosphatase 1 (PP1i) en C-terminal.

Nos résultats montrent, d'une part, que LIMK2-1 existe sous forme de protéine et qu'elle est exprimée dans le système nerveux central chez l'homme, en particulier au cours du neurodéveloppement. D'autre part, il apparaît que cette isoforme favorise la polymérisation de l'actine. Cette action semble indépendante de l'activité kinase puisque LIMK2-1 ne phosphoryle pas la cofiline. Nous avons également montré que le domaine PP1i interagissait spécifiquement avec la phosphatase 1 et des résultats complémentaires suggèrent un rôle de ce domaine dans l'inhibition de la dépolymérisation de l'actine.

Ces données mettent en évidence un mécanisme moléculaire nouveau pour une protéine de la famille des LIMK et soulignent l'intérêt d'étudier ces protéines afin de mieux comprendre leur implication dans les troubles cognitifs et dans la neurofibromatose de type 1.

Mots clés : Neurofibromatose de type 1, déficience intellectuelle, LIMK2, LIMK2-1, cofiline, actine

LIMK1 and LIMK2 are serine/threonine kinases that phosphorylate and subsequently inactivate cofilin, an actin-depolymerizing factor. Neurofibromin, the protein responsible for neurofibromatosis type 1, negatively regulates these proteins that may be involved in tumoral and cognitive aspects of the disease through their role in actin dynamics.

We studied LIMK2-1, a hominidae-specific isoform previously involved in intellectual disability. This isoform possesses a truncated kinase domain and a protein phosphatase 1 inhibitory (PP1i) domain at its C-terminal extremity.

Our results showed that LIMK2-1 exists at a protein level and that it is expressed in human central nervous system, especially during neurodevelopment. Moreover, LIMK2-1 promotes actin polymerization independently from a kinase activity, since this isoform does not phosphorylate cofilin. We also highlighted an interaction between the PP1i domain and protein phosphatase 1 and complementary results suggest a role of this domain in the inhibition of actin depolymerization.

These data highlight a new molecular mechanism for a LIMK protein and emphasize the interest of studying these proteins to understand their involvement in cognitive disorders and in neurofibromatosis type 1.

Keywords: Neurofibromatosis type 1, intellectual disability, LIMK2-1, cofilin, actin