



Master 2 Bioinformatique de Nantes Université

Année 2026

Mémoire de stage

**Étude par dynamique moléculaire d'un nouveau mécanisme de
régulation des LIM kinases LIMK1 et LIMK2**

KPAKOU Yétoua Romain



ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique), UMR 7311,
Université d'Orléans, Orléans

Encadrante : Dr Samia Aci-Sèche
ICOA, UMR 7311, Université d'Orléans

Stage du 16 mars 2026 au 15 septembre 2026

Résumé

Les LIM kinases, LIMK1 et LIMK2, régulent la dynamique du cytosquelette d'actine en phosphorylant la cofiline, et constituent des cibles thérapeutiques dans le cancer et les maladies neurologiques. Leur activation dépend d'une homodimérisation et de la phosphorylation de leur boucle d'activation. Des travaux expérimentaux ont mis en évidence le rôle d'une tyrosine régulatrice, Y632 chez LIMK1 et Y630 chez LIMK2, située à l'extrémité du domaine kinase, nécessaire à l'activité et à la dimérisation. Cette tyrosine adopte deux orientations, corrélées à deux positions de l'hélice α C, un élément participant à la définition de l'état d'activation.

Ce travail a étudié, par la simulation de dynamique moléculaire, la relation entre cette tyrosine et l'hélice α C, ainsi que la place de ce résidu dans la dimérisation. Seize systèmes ont été analysés, couvrant les deux isoformes, la protéine sauvage et trois mutants, dans les deux orientations de la tyrosine. Les interfaces de dimérisation ont été examinées à partir de structures d'homodimères et de modèles prédictifs.

Les simulations ont établi une corrélation entre l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice α C, appuyée par trois marqueurs concordants et retrouvée chez les deux isoformes. L'étude des mutants a montré que le cycle aromatique et le groupe hydroxyle de la tyrosine ont des effets opposés sur la flexibilité de l'hélice, et qu'une mutation distante peut découpler l'orientation de la tyrosine de la position de l'hélice. L'analyse des interfaces a montré que la tyrosine n'est pas présente aux interfaces de dimérisation, ce qui a conduit à proposer, à titre d'hypothèse, un rôle indirect de ce résidu dans la dimérisation, par l'intermédiaire de l'hélice α C. Ce travail caractérise ainsi un couplage conservé entre la tyrosine régulatrice et l'hélice α C, et ouvre des pistes pour comprendre le rôle de cette tyrosine dans la régulation des LIM kinases.

Mots-clés : LIM kinases, dynamique moléculaire, hélice α C, tyrosine régulatrice, dimérisation, mécanisme d'activation.

Abstract

LIM kinases, LIMK1 and LIMK2, regulate actin cytoskeleton dynamics by phosphorylating cofilin, and are therapeutic targets in cancer and neurological diseases. Their activation depends on homodimerization and on phosphorylation of their activation loop. Experimental work has highlighted the role of a regulatory tyrosine, Y632 in LIMK1 and Y630 in LIMK2, located at the end of the kinase domain, required for both activity and dimerization. This tyrosine adopts two orientations, correlated with two positions of the α C helix, an element contributing to the definition of the activation state.

This work investigated, using molecular dynamics simulations, the relationship between this tyrosine and the α C helix, as well as the role of this residue in dimerization. Sixteen systems were analyzed, covering both isoforms, the wild-type protein and three mutants, in the two orientations of the tyrosine. The dimerization interfaces were examined from homodimer structures and predictive models.

The simulations established a correlation between the orientation of the tyrosine and the position of the α C helix, supported by three concordant markers and found in both isoforms. The study of the mutants showed that the aromatic ring and the hydroxyl group of the tyrosine have opposite effects on the flexibility of the helix, and that a distant mutation can uncouple the orientation of the tyrosine from the position of the helix. Analysis of the interfaces showed that the tyrosine is not present at the dimerization interfaces, which led to propose, as a hypothesis, an indirect role of this residue in dimerization, through the α C helix. This work thus characterizes a conserved coupling between the regulatory tyrosine and the α C helix, and opens avenues for understanding the role of this tyrosine in the regulation of LIM kinases.

Keywords : LIM kinases, molecular dynamics, α C helix, regulatory tyrosine, dimerization, activation mechanism.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	i
1 Contexte et problématique	1
1.1 Les LIM kinases, régulateurs de la dynamique de l'actine	1
1.2 L'activation des LIM kinases par phosphorylation et par dimérisation	1
1.3 LIMK1 et LIMK2, un domaine kinase conservé et des extrémités divergentes	1
1.4 Y632 et Y630, un résidu essentiel dont le mode d'action reste à élucider	1
1.5 Deux conformations de la tyrosine corrélées à la position de l'hélice α C	2
1.6 Les mutations P394E et P386E, une perturbation du site de liaison de Hsp90	2
1.7 Problématique et objectifs	3
2 Systèmes étudiés et paramètres d'analyse	4
2.1 Seize systèmes monomériques et trois structures dimériques	4
2.2 Nomenclature et correspondance des résidus entre isoformes	5
2.3 Les paramètres géométriques suivis et leur pertinence	6
3 La tyrosine régulatrice et son couplage à l'hélice αC	7
3.1 Deux orientations stables de la tyrosine régulatrice	7
3.2 Corrélation entre l'orientation de la tyrosine, le pont salin et la position de l'hélice α C	7
3.3 Les différences de voisinage de la tyrosine entre les deux orientations	8
4 L'apport des mutations à la compréhension du mécanisme	10
4.1 La mutation Y632F rigidifie l'hélice α C	10
4.2 Une flexibilité de l'hélice α C qui dépend de l'orientation initiale de la tyrosine	10
4.3 P394E et P386E, une action allostérique sur la tyrosine et un lien avec Hsp90	12
4.4 Traits communs et différences entre les deux isoformes	13
5 Les interfaces de dimérisation et la place de la tyrosine	16
5.1 Deux modes d'association distincts dans les homodimères 8S3X et 4TPT	16
5.2 La tyrosine régulatrice absente des interfaces de dimérisation	16
5.3 Des sites de transphosphorylation éloignés du site catalytique opposé	17
5.4 L'absence d'interface prédite entre domaines kinases isolés	17
5.5 Un rôle possible de la tyrosine dans la dimérisation par l'intermédiaire de l'hélice α C	18
5.6 Un couplage entre l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice α C, commun aux deux isoformes	19
6 Discussion	21
6.1 Un couplage entre l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice α C, commun aux deux isoformes	21
6.2 L'apport des mutations à la compréhension du rôle de la tyrosine	21
6.3 La place de la tyrosine dans la dimérisation	21
6.4 Limites du travail	22
6.5 Perspectives	22
Conclusion	24
Bibliographie	25
Annexes	26

Table des figures

1	Organisation en domaines des LIM kinases LIMK1 et LIMK2. Les deux isoformes partagent la même architecture modulaire, deux domaines LIM à doigts de zinc et un domaine PDZ dans la région amino-terminale, une région désordonnée riche en proline et sérine, et un domaine kinase dans la région carboxy-terminale. La tyrosine régulatrice, Y632 chez LIMK1 et Y630 chez LIMK2, est située à l'extrémité carboxy-terminale, en aval du domaine kinase. Chez LIMK1, 647 résidus, les domaines occupent les positions suivantes, LIM1 de 25 à 75, LIM2 de 84 à 137, PDZ de 165 à 258, région désordonnée de 260 à 319, domaine kinase de 339 à 604. Chez LIMK2, 638 résidus, LIM1 de 12 à 63, LIM2 de 72 à 124, PDZ de 152 à 239, région désordonnée de 279 à 304, domaine kinase de 331 à 608. Les bornes sont indiquées selon UniProt, P53667 pour LIMK1 et P53671 pour LIMK2.	2
2	La tyrosine régulatrice adopte deux orientations distinctes, out en conformation active et in en conformation inactive, corrélées à l'état du pont salin de l'hélice αC	5
3	Distribution de l'angle dièdre χ_1 de la tyrosine régulatrice au cours des simulations, pour les deux isoformes et les deux orientations initiales. Les histogrammes montrent la séparation des deux orientations.	7
4	Deux populations distinctes selon l'orientation de la tyrosine, corrélées à l'état du pont salin, chez LIMK1 et LIMK2. Chaque point représente une conformation échantillonnée au cours des simulations. Lorsque la tyrosine est en position out, le pont salin est formé la majorité du temps. Lorsqu'elle est en position in, il reste rompu.	8
5	Profil de fluctuation par résidu lorsque la tyrosine est en position out, pour LIMK1. Les quatre systèmes, sauvage et trois mutants, sont représentés en courbes de RMSF le long de la séquence, la zone de l'hélice αC étant surlignée. Le mutant Y632F présente une hélice αC plus rigide que les autres systèmes.	10
6	La suppression du groupe hydroxyle de la tyrosine rigidifie l'hélice αC chez LIMK1. RMSF moyen de l'hélice αC pour la protéine sauvage et les trois mutants, lorsque la tyrosine est en position out. Le mutant Y632F présente l'hélice la plus rigide, tandis que le mutant Y632A, qui perd aussi le cycle aromatique, revient au niveau de la protéine sauvage.	11
7	La flexibilité de l'hélice αC du mutant Y632F s'inverse selon l'orientation initiale de la tyrosine, chez LIMK1. RMSF moyen de l'hélice αC pour la protéine sauvage et les trois mutants, selon que la tyrosine est initiée en position out ou en position in. Seul le mutant Y632F change nettement de comportement, présentant l'hélice la plus rigide lorsque la tyrosine est en position out et la plus mobile lorsqu'elle est en position in.	12
8	La mutation de la proline déplace la tyrosine vers la position in chez les deux isoformes. Distribution de l'angle dièdre χ_1 de la tyrosine régulatrice pour la protéine sauvage et le mutant de la proline, tous deux initiés avec la tyrosine en position out. Chez le sauvage, la tyrosine reste en position out, autour de 182 degrés pour LIMK1 et 172 degrés pour LIMK2. Chez le mutant, elle se déplace vers la position in, autour de 298 degrés pour LIMK1 et 292 degrés pour LIMK2.	13
9	Localisation de la proline P394 par rapport à l'hélice αC et à la tyrosine régulatrice chez LIMK1. La structure du domaine kinase sous sa forme active, PDB 3S95, montre la tyrosine Y632 en rouge, l'hélice αC en bleu, le motif catalytique DFG en jaune, et la proline P394 en orange. La proline est située dans la boucle qui suit l'hélice αC , région correspondant au site de liaison de la protéine chaperonne Hsp90, à distance de la tyrosine régulatrice.	14

10	Deux modes d'association distincts dans les homodimères de LIMK2. Dans la structure 8S3X, les monomères s'associent tête-bêche par leurs lobes carboxy-terminaux, avec une interface réduite de 934 angströms carrés par face. Dans la structure 4TPT, ils s'associent parallèlement par leurs lobes amino-terminaux, avec une interface étendue de 2280 angströms carrés par face. Les deux monomères sont représentés en bleu et saumon, les résidus d'interface, à moins de 5 angströms de l'autre monomère, en bâtons de teinte foncée.	16
11	Position de la tyrosine régulatrice par rapport à l'interface de dimérisation. Pour chaque structure, la tyrosine est mise en évidence sur chaque monomère, avec la distance au monomère voisin indiquée. La tyrosine est éloignée de l'interface dans les deux structures.	17
12	Hypothèse du rôle indirect de la tyrosine dans la dimérisation par l'intermédiaire de l'hélice α C. Schéma conceptuel reliant l'orientation de la tyrosine, la conformation de l'hélice α C, et la compétence pour la dimérisation ou la liaison de Hsp90.	19
A1	Une différence de voisinage aromatique faible et non discriminante entre les deux orientations de la tyrosine. Distances entre la tyrosine régulatrice et la phénylalanine voisine, pour les deux orientations, chez LIMK2. La différence, de l'ordre de l'angström, est faible au regard de la dispersion des mesures.	27
A2	Comparaison du profil de fluctuation par résidu entre LIMK1 et LIMK2 lorsque la tyrosine est en position out. Les profils de RMSF des deux isoformes sont présentés pour la protéine sauvage et les mutants. LIMK2 présente une mobilité globale plus élevée que LIMK1.	28
A3	Mécanisme d'activation des LIM kinases. La phosphorylation de la boucle d'activation par ROCK et PAK et l'homodimérisation, favorisée par la protéine chaperonne Hsp90, concourent à l'activation de la kinase, qui phosphoryle alors la cofiline et stabilise les filaments d'actine. L'étape étudiée dans ce travail, l'homodimérisation suivie de la transphosphorylation, est encadrée.	29

Liste des tableaux

1	Les seize systèmes étudiés en dynamique moléculaire.	4
2	Correspondance des résidus clés entre les deux isoformes.	6
3	Découplage de l'orientation de la tyrosine et de la position de l'hélice α C chez les mutants de la proline.	13
4	Distances entre les sites de transphosphorylation et le site catalytique opposé. Pour chaque site phosphorylable résolu, T625, S627 et Y630, sa distance à l'aspartate catalytique du monomère opposé dans les deux structures, comparée au seuil de 8 angströms requis.	18
5	Scores de confiance des modèles d'homodimère prédits par AlphaFold. Pour chaque prédiction, séquence entière de LIMK1 et domaine kinase de LIMK2, les scores ipTM et pTM, l'erreur de position inter-chaînes, et la qualité de l'interface.	18
A1	Récapitulatif des paramètres géométriques et de leur définition.	26
A2	Découplage de l'orientation de la tyrosine et de la position de l'hélice α C chez les mutants de la proline, version complète incluant les systèmes sauvages en position out.	27
A3	Caractéristiques des interfaces de dimérisation des homodimères de LIMK2.	27

1 Contexte et problématique

1.1 Les LIM kinases, régulateurs de la dynamique de l'actine

Les LIM kinases, LIMK1 et LIMK2, sont des enzymes qui contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine. Elles agissent en phosphorylant la cofiline, une protéine qui dépolymérise les filaments d'actine. Lorsque la cofiline est phosphorylée par les LIM kinases, elle perd cette capacité, ce qui stabilise les filaments. En régulant l'activité de la cofiline, les LIM kinases interviennent ainsi dans les processus qui dépendent du remodelage de l'actine, comme la migration cellulaire, la division et le maintien de la forme des cellules (Bernard, 2007).

Par ce rôle, les LIM kinases sont impliquées dans plusieurs situations pathologiques. Leur dérèglement est associé à la progression et à la dissémination de certains cancers, ainsi qu'à des troubles neurologiques et du développement (Manetti, 2012 ; Meng et al., 2002). Ces implications font des LIM kinases des cibles thérapeutiques d'intérêt, et motivent l'étude détaillée des mécanismes qui gouvernent leur activité (Manetti, 2012).

1.2 L'activation des LIM kinases par phosphorylation et par dimérisation

L'activité des LIM kinases est finement régulée. Leur activation repose sur plusieurs étapes complémentaires.

La première est une phosphorylation de la boucle d'activation, réalisée par des kinases situées en amont. Les kinases ROCK et PAK phosphorylent une thréonine de la boucle d'activation, la thréonine 508 chez LIMK1 et 505 chez LIMK2, ce qui correspond au mode d'activation classique des kinases (Ohashi et al., 2000 ; Edwards et al., 1999).

La seconde étape fait intervenir l'homodimérisation. Deux molécules de LIM kinase s'associent, ce qui permet à l'une de phosphoryler l'autre, un mécanisme appelé transphosphorylation. Cette étape est nécessaire à l'activation (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience). La protéine chaperonne Hsp90 participe à ce mécanisme, sa liaison étant nécessaire à l'homodimérisation des LIM kinases (Li et al., 2006 ; Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience).

L'activation des LIM kinases ne repose donc pas seulement sur la phosphorylation de la boucle d'activation, mais aussi sur leur capacité à dimériser. Comprendre ce qui gouverne cette dimérisation est ainsi un enjeu central pour comprendre leur régulation.

1.3 LIMK1 et LIMK2, un domaine kinase conservé et des extrémités divergentes

Les deux isoformes, LIMK1 et LIMK2, partagent une architecture commune. Elles possèdent, à leur extrémité amino-terminale, deux domaines LIM et un domaine PDZ, impliqués dans les interactions avec d'autres protéines, et à leur extrémité carboxy-terminale, un domaine kinase qui porte l'activité catalytique (Bernard, 2007 ; Villalonga-Rosso, 2024).

Le domaine kinase est fortement conservé entre les deux isoformes, ce qui suggère un mécanisme catalytique commun. Les régions qui l'encadrent, en revanche, présentent davantage de divergences. Cette combinaison, un cœur catalytique conservé et des extrémités plus variables, invite à étudier les deux isoformes en parallèle, afin de distinguer ce qui relève d'un mécanisme partagé de ce qui est propre à chacune. C'est l'un des choix méthodologiques de ce travail, qui porte sur LIMK1 et LIMK2 conjointement.

1.4 Y632 et Y630, un résidu essentiel dont le mode d'action reste à élucider

Des travaux récents menés par les collaborateurs biologistes ont mis en évidence le rôle déterminant d'une tyrosine située à l'extrémité carboxy-terminale du domaine kinase, la tyrosine 632 chez LIMK1 et 630 chez LIMK2 (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience). La substitution de cette tyrosine en alanine abolit l'activité des LIM kinases sur la cofiline. De façon éclairante, sa substitution en phénylalanine, qui conserve le cycle aromatique mais supprime le groupe hydroxyle, préserve cette activité. Cette différence indique que le cycle aromatique de la tyrosine est important pour la fonction, indépendamment de son groupe hydroxyle.

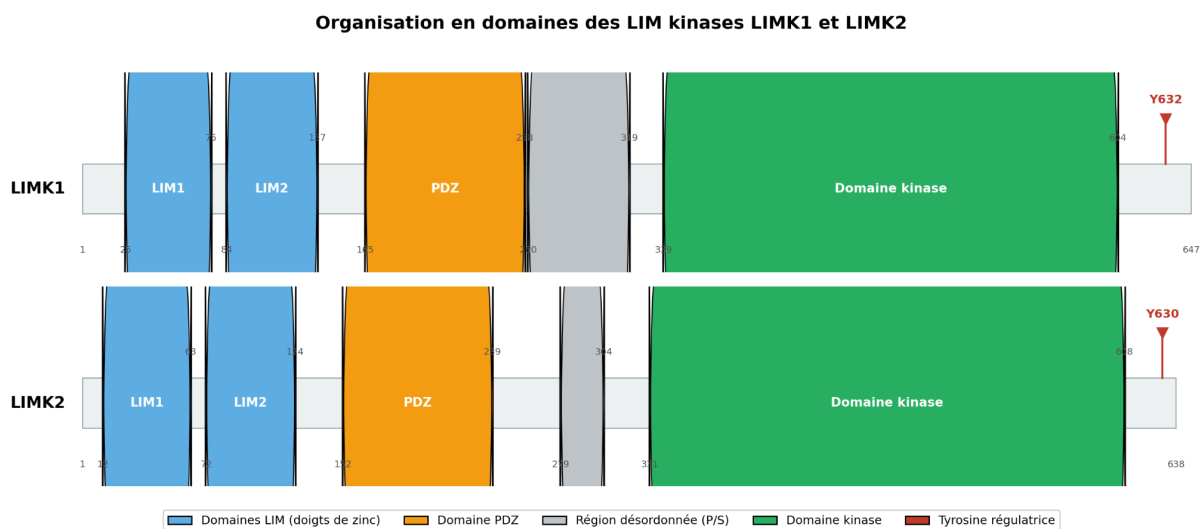


Figure 1 – Organisation en domaines des LIM kinases LIMK1 et LIMK2. Les deux isoformes partagent la même architecture modulaire, deux domaines LIM à doigts de zinc et un domaine PDZ dans la région amino-terminale, une région désordonnée riche en proline et sérine, et un domaine kinase dans la région carboxy-terminale. La tyrosine régulatrice, Y632 chez LIMK1 et Y630 chez LIMK2, est située à l'extrémité carboxy-terminale, en aval du domaine kinase. Chez LIMK1, 647 résidus, les domaines occupent les positions suivantes, LIM1 de 25 à 75, LIM2 de 84 à 137, PDZ de 165 à 258, région désordonnée de 260 à 319, domaine kinase de 339 à 604. Chez LIMK2, 638 résidus, LIM1 de 12 à 63, LIM2 de 72 à 124, PDZ de 152 à 239, région désordonnée de 279 à 304, domaine kinase de 331 à 608. Les bornes sont indiquées selon UniProt, P53667 pour LIMK1 et P53671 pour LIMK2.

Ces mêmes travaux ont montré que cette tyrosine est nécessaire à l'homodimérisation des LIM kinases. La substitution en alanine empêche la dimérisation, tandis que la substitution en phénylalanine la préserve (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience). La tyrosine apparaît donc comme un résidu essentiel, à la fois pour l'activité et pour la dimérisation. Son mode d'action précis, en revanche, reste à élucider, ce qui constitue le point de départ de ce travail.

1.5 Deux conformations de la tyrosine corrélées à la position de l'hélice αC

L'analyse des structures cristallographiques des domaines kinases de LIM kinases a apporté un éclairage sur le comportement de cette tyrosine. Parmi les quatorze structures disponibles dans la Protein Data Bank, cette tyrosine adopte deux orientations distinctes, décrites comme les conformations in et out, selon que sa chaîne latérale pointe vers le cœur de la protéine ou vers le solvant (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience).

Ces deux orientations sont corrélées à deux positions de l'hélice αC , un élément structural du site catalytique qui participe, avec le motif DFG et la boucle d'activation, à la définition de l'état d'activation de la kinase. Lorsque la tyrosine est en position out, l'hélice αC occupe sa position active. Lorsque la tyrosine est en position in, l'hélice s'en écarte. Cette corrélation a été relevée dans la quasi-totalité des structures examinées (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience).

Cette observation soulève une question. La tyrosine régulatrice est située à distance du site catalytique, à l'extrémité du domaine kinase. Pourtant, son orientation accompagne la position de l'hélice αC , un élément central de l'activité. La façon dont ces deux éléments sont reliés, et la stabilité de cette relation en solution, ne peuvent pas être établies à partir des seules structures cristallographiques, qui offrent des images statiques. L'étude de la dynamique des LIM kinases par la simulation permet d'aborder cette question.

1.6 Les mutations P394E et P386E, une perturbation du site de liaison de Hsp90

Un autre résidu présente un intérêt particulier pour la compréhension de ce mécanisme. Une proline située en aval de l'hélice αC , la proline 394 chez LIMK1 et 386 chez LIMK2, se trouve dans une région

identifiée comme le site de liaison de la protéine chaperonne Hsp90 (Li et al., 2006). Des travaux antérieurs ont montré que la substitution de cette proline en glutamate réduit fortement l'association entre la LIM kinase et Hsp90 (Li et al., 2006).

Cette mutation présente donc un double intérêt. D'une part, elle perturbe un site fonctionnel important, la liaison de Hsp90 étant nécessaire à la dimérisation. D'autre part, elle est située à distance de la tyrosine régulatrice, ce qui permet d'examiner si une perturbation éloignée peut influencer le comportement de cette tyrosine et de l'hélice αC . Cette mutation a donc été incluse dans ce travail, pour son effet sur la dynamique de la protéine.

1.7 Problématique et objectifs

L'ensemble de ces éléments dessine une situation où une tyrosine, située à distance du site catalytique, est associée à la fois à l'activité des LIM kinases, à la position de l'hélice αC et à leur capacité de dimérisation. Les structures cristallographiques révèlent une corrélation entre l'orientation de cette tyrosine et la position de l'hélice αC , mais ne permettent pas d'en comprendre le comportement dynamique, ni de préciser le rôle de la tyrosine dans la dimérisation.

Ce travail se propose d'aborder ces questions par la simulation de dynamique moléculaire, selon deux objectifs.

Le premier est de caractériser, au cours du temps, la relation entre l'orientation de la tyrosine régulatrice et la position de l'hélice αC , et de préciser comment cette relation relie la tyrosine aux éléments du site catalytique que sont l'hélice αC et le motif DFG. Cette analyse porte sur les deux isoformes, ainsi que sur des mutants de la tyrosine et de la proline, afin de distinguer les traits communs des différences entre isoformes et de préciser le rôle des groupes chimiques de la tyrosine.

Le second est d'examiner les interfaces de dimérisation des LIM kinases à partir des structures d'homodimères disponibles et de modèles prédictifs, afin de situer la tyrosine régulatrice par rapport à ces interfaces et de poser des hypothèses sur le mécanisme de transphosphorylation.

En reliant l'analyse de la dynamique du domaine kinase à celle de la dimérisation, ce travail vise à proposer des hypothèses sur la façon dont la tyrosine régulatrice participe à la régulation des LIM kinases.

2 Systèmes étudiés et paramètres d'analyse

2.1 Seize systèmes monomériques et trois structures dimériques

L'étude repose sur deux ensembles de systèmes, correspondant aux deux volets du projet :

Un ensemble de seize systèmes monomériques pour les deux isoformes, soumis à des simulations de dynamique moléculaire.

Trois structures dimériques, pour l'étude des interfaces.

Les systèmes étudiés en dynamique moléculaire. Seize systèmes ont été analysés, huit pour LIMK1 et huit pour LIMK2. Pour chaque isoforme, quatre variantes ont été considérées. La première est la protéine sauvage. Les deux suivantes sont des mutants de la tyrosine régulatrice. La substitution en phénylalanine, Y632F, ne modifie pas l'activité des LIM kinases, tandis que la substitution en alanine, Y632A, l'abolit. Cette différence d'effet sur l'activité est la raison pour laquelle ces deux mutations sont comparées. Sur le plan chimique, la phénylalanine conserve le cycle aromatique de la tyrosine mais supprime le groupement hydroxyle, alors que l'alanine supprime les deux, ce qui permet de distinguer la contribution de chacun de ces éléments. La dernière variante est le mutant de la proline située en aval de l'hélice αC , remplacée par un glutamate. Cette mutation, dont les effets sur l'activité des LIM kinases ont été présentés en introduction, est étudiée ici pour son action sur la dynamique de la protéine. Aux quatre systèmes sauvages établis par l'équipe, ce travail a ajouté les systèmes mutants.

Table 1 – Les seize systèmes étudiés en dynamique moléculaire.

Isoforme	Variante	Conformation (out)	active	Conformation (in)	inactive
LIMK1	Sauvage	Y632ext.WT		Y632int.WT	
LIMK1	Y632F	F632ext		F632int	
LIMK1	Y632A	A632ext		A632int	
LIMK1	Proline P394E	Y632ext.P394E		Y632int.P394E	
LIMK2	Sauvage	Y630ext.WT		Y630int.WT	
LIMK2	Y630F	F630ext		F630int	
LIMK2	Y630A	A630ext		A630int	
LIMK2	Proline P386E	Y630ext.P386E		Y630int.P386E	

Les conformations de départ ont été issues des structures cristallographiques de LIMK1, la forme dont l'hélice αC est en position active à partir de la structure 3S95, et la forme dont l'hélice αC est en position inactive à partir de la structure 5NXC.

Les structures ont été récupérées de la RCSB PDB et superposées avec l'outil MatchMaker de Chimera. Parmi les quatorze structures ainsi obtenues, deux ont été retenues comme représentatives de chaque état conformationnel de la tyrosine régulatrice, la structure 3S95 pour la conformation Y632-out et la structure 5NXC pour la conformation Y632-in. Pour ces deux structures, les résidus manquants, notamment au sein de la boucle d'activation, ont été modélisés par homologie à l'aide de la suite Modeller version 10.4, en utilisant la structure 5HVK comme matrice.

Le protocole de simulation est celui établi par l'équipe. La protonation des chaînes latérales a été fixée à pH 7,4, la topologie générée avec AmberTools 24 et le champ de force ff19SB. Chaque système a été solvaté dans une boîte d'eau OPC, avec une distance d'au moins 12 angströms entre le soluté et le bord de la boîte, puis le système a été neutralisé et une concentration ionique de 0,15 mole par litre a été ajoutée. Les simulations ont été conduites avec le module PMEMD du programme AMBER20. Le détail complet du protocole, minimisation, chauffage et équilibration, est reporté en annexe.

Les coordonnées du système ont été sauvegardées toutes les nanosecondes dans les fichiers de trajectoires. Tous les systèmes ont d'abord été simulés sur deux microsecondes. Les premières analyses menées sur les systèmes LIMK1 donnant des résultats ambigus, les profils de RMSD et de RMSF restant difficiles à interpréter et l'état du pont salin catalytique demeurant incertain dans certains systèmes, les simulations des systèmes LIMK1 ont été prolongées d'une microseconde, jusqu'à trois

microsecondes, pour lever ces ambiguïtés. La même démarche pourra être réalisée par la suite pour les systèmes LIMK2 en cas de besoin.

Les structures de dimères. Parmi les quatorze structures de domaines kinases de LIM kinases disponibles dans la Protein Data Bank, seules deux se présentent sous la forme d'homodimères, les structures 8S3X et 4TPT, toutes deux relatives à LIMK2. Ce sont donc ces deux structures qui ont été retenues pour l'étude des interfaces de dimérisation. Elles présentent deux modes d'association différents, décrits dans la partie 5.

À ces structures expérimentales s'ajoutent des modèles d'homodimères générés avec AlphaFold pour les deux isoformes, afin d'évaluer si une interface de dimérisation entre domaines kinases peut être prédite. Les modalités de cette prédiction sont détaillées en section 5.

2.2 Nomenclature et correspondance des résidus entre isoformes

Deux conventions doivent être précisées avant la présentation des résultats, car elles conditionnent la lecture de l'ensemble du travail.

La première concerne la désignation des conformations de la tyrosine régulatrice. La tyrosine adopte deux orientations, décrites dans l'étude fondatrice comme les conformations in et out, selon que sa chaîne latérale pointe vers le cœur de la protéine ou vers le solvant. L'analyse des structures cristallographiques a montré que ces deux orientations sont corrélées à deux positions de l'hélice αC , dont la conformation participe, avec le motif DFG et la boucle d'activation, à la définition de l'état d'activation de la kinase. Lorsque la tyrosine est en position out, l'hélice αC est en position active et le pont salin entre le glutamate de l'hélice et la lysine catalytique est formé. Lorsque la tyrosine est en position in, l'hélice αC est en position inactive et ce pont salin est rompu. Dans la suite de ce mémoire, les systèmes initiés avec la tyrosine en position out sont désignés par le terme actif, et ceux initiés avec la tyrosine en position in par le terme inactif, en référence à la conformation de l'hélice αC associée.

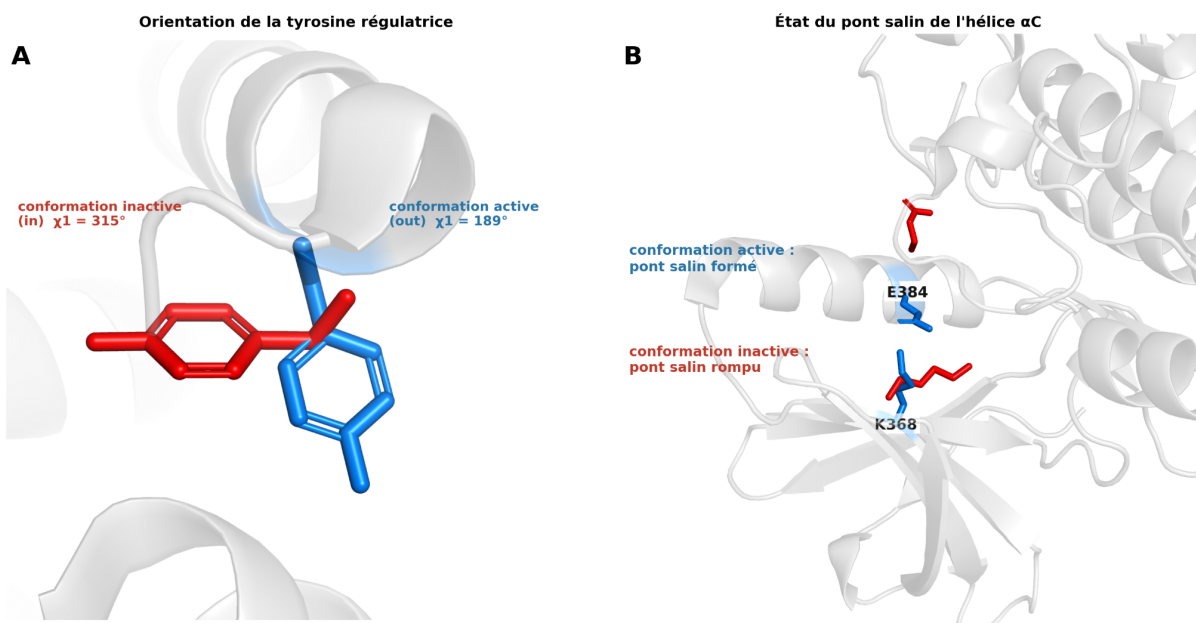


Figure 2 – La tyrosine régulatrice adopte deux orientations distinctes, out en conformation active et in en conformation inactive, corrélées à l'état du pont salin de l'hélice αC .

La seconde convention concerne la numérotation des résidus. Les deux isoformes présentent un décalage de numérotation entre elles, ainsi qu'un décalage entre la numérotation biologique et celle employée dans les fichiers de simulation. Les résidus sont désignés dans ce mémoire par leur numérotation biologique. Les principaux résidus étudiés et leur correspondance entre les deux isoformes sont rassemblés dans le tableau 2.

Table 2 – Correspondance des résidus clés entre les deux isoformes.

Élément fonctionnel	LIMK1	LIMK2
Tyrosine régulatrice	Y632	Y630
Thréonine de la boucle d'activation	T508	T505
Lysine catalytique	K368	K360
Glutamate de l'hélice α C	E384	E376
Proline en aval de l'hélice α C	P394	P386
Motif DFG	D478-F479- G480	D469-F470- G471
Aspartate catalytique (motif HRD)	D460	D451

2.3 Les paramètres géométriques suivis et leur pertinence

L'analyse des trajectoires repose sur un ensemble de grandeurs géométriques, choisies pour rendre compte du comportement de la tyrosine régulatrice et de l'hélice α C au cours des simulations. Chacune est mesurée au cours du temps sur l'ensemble des systèmes.

L'orientation de la tyrosine régulatrice. L'angle dièdre χ_1 décrit l'orientation de la chaîne latérale de la tyrosine. Il permet de distinguer ses deux conformations et de suivre les éventuels basculements de l'une à l'autre au cours de la simulation. Cet angle constitue le marqueur direct de l'orientation de la tyrosine.

Le pont salin catalytique. La distance entre la lysine catalytique et le glutamate de l'hélice α C mesure la formation ou la rupture du pont salin qui les relie. Ce pont salin est un marqueur classique de la position de l'hélice α C, il est formé lorsque l'hélice est en position active et rompu lorsqu'elle s'en écarte. Sa distance renseigne donc sur la position de l'hélice.

La position de l'hélice α C par rapport au site catalytique. La distance entre l'hélice α C et le motif DFG rend compte des mouvements de l'hélice au cours de la simulation. Elle complète l'information donnée par le pont salin en décrivant la géométrie du site catalytique.

La stabilité et la flexibilité. L'écart quadratique moyen, ou RMSD, mesure la déviation de la structure par rapport à une référence au cours du temps et rend compte de sa stabilité globale. La fluctuation quadratique moyenne par résidu, ou RMSF, mesure l'amplitude des mouvements de chaque résidu autour de sa position moyenne et rend compte de la flexibilité locale. Ces deux grandeurs ont été calculées après superposition des structures. Selon les cas, la superposition a été réalisée sur l'ensemble de la protéine ou sur une région stable choisie comme référence, afin de distinguer les mouvements propres d'une région du reste de la protéine. Cette distinction est précisée lors de la présentation des résultats correspondants.

Le voisinage de la tyrosine régulatrice. Les distances entre la tyrosine et les résidus aromatiques de son environnement immédiat ont également été suivies. Ces mesures servent à décrire les différences d'environnement entre les deux conformations de la tyrosine, à titre descriptif. L'angle χ_1 et le pont salin catalytique demeurent les grandeurs principales pour caractériser respectivement l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice α C.

L'ensemble de ces paramètres est récapitulé dans le tableau de l'annexe.

3 La tyrosine régulatrice et son couplage à l'hélice αC

3.1 Deux orientations stables de la tyrosine régulatrice

L'analyse de l'angle dièdre χ_1 de la tyrosine régulatrice met en évidence deux orientations distinctes de sa chaîne latérale, retrouvées chez les deux isoformes. Dans les systèmes initiés avec la tyrosine en position in, sa chaîne latérale reste dirigée vers le cœur de la protéine, autour d'une valeur de χ_1 d'environ 298 degrés pour LIMK1 et 302 degrés pour LIMK2. Cette orientation est très stable, la chaîne latérale restant confinée autour de cette valeur pendant la quasi totalité de la simulation. Dans les systèmes initiés avec la tyrosine en position out, sa chaîne latérale est dirigée vers le solvant, autour d'une valeur d'environ 182 degrés pour LIMK1, avec une dispersion plus large. Ces valeurs sont en accord avec celles mesurées sur les structures cristallographiques de référence, ce qui confirme que les orientations observées en simulation ne sont pas des artefacts.

La correspondance entre les deux isoformes indique que ce comportement est une propriété commune, et non spécifique de l'une d'elles. L'orientation in apparaît plus stable et mieux définie que l'orientation out dans les deux isoformes, la chaîne latérale de la tyrosine étant plus contrainte lorsqu'elle est nichée dans le cœur de la protéine que lorsqu'elle est exposée au solvant.

Au cours des simulations, chaque système reste très majoritairement dans l'orientation où il a été initié. Le prolongement des simulations de LIMK1 jusqu'à trois microsecondes montre que ces orientations sont stables sur une échelle de temps étendue, et non des positions transitoires propres au début de la trajectoire. La comparaison entre la première et la seconde moitié des trajectoires ne fait apparaître aucun changement de comportement. Aucun basculement spontané et durable d'une orientation à l'autre n'est observé pour la protéine sauvage, ce qui indique que les deux orientations correspondent à deux positions stables de la chaîne latérale et non à un simple équilibre rapide entre positions voisines.

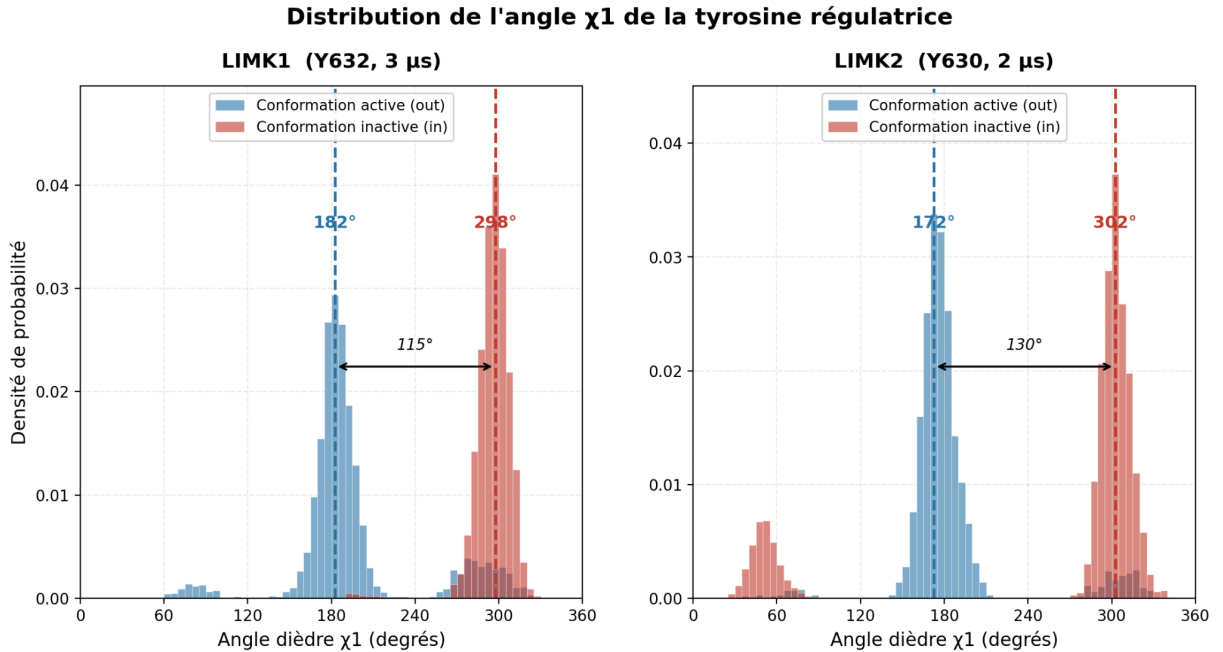


Figure 3 – Distribution de l'angle dièdre χ_1 de la tyrosine régulatrice au cours des simulations, pour les deux isoformes et les deux orientations initiales. Les histogrammes montrent la séparation des deux orientations.

3.2 Corrélation entre l'orientation de la tyrosine, le pont salin et la position de l'hélice αC

L'orientation de la tyrosine régulatrice ne varie pas de façon isolée. Elle s'accompagne d'un changement de position de l'hélice αC , mis en évidence par deux mesures complémentaires, l'état du pont salin catalytique et la distance entre l'hélice αC et le motif DFG.

Le pont salin reliant la lysine catalytique au glutamate de l'hélice α C présente deux comportements nettement distincts selon l'orientation de la tyrosine. Dans les systèmes où la tyrosine est en position out, il est formé la majorité du temps, à une distance moyenne de 3,4 angströms pour LIMK1 et 3,8 angströms pour LIMK2, formé respectivement 83 et 67 pour cent du temps. Dans les systèmes où la tyrosine est en position in, il reste rompu pendant la totalité de la simulation, la distance moyenne atteignant environ 17 angströms pour les deux isoformes. Cette séparation nette indique que l'orientation de la tyrosine et l'état du pont salin sont liés, une tyrosine en position out s'accompagnant d'un pont salin formé, marqueur d'une hélice α C en position active, et une tyrosine en position in d'un pont salin rompu, marqueur d'une hélice α C en position inactive.

La distance entre l'hélice α C et le motif DFG confirme ce lien. Elle est d'environ 5,7 angströms lorsque la tyrosine est en position out et de 14,3 angströms lorsqu'elle est en position in pour LIMK1, et de 5,6 à 10,6 angströms pour LIMK2. L'hélice α C est donc proche du motif DFG lorsque la tyrosine est en position out, et s'en éloigne lorsqu'elle est en position in. Les valeurs correspondant à la position out sont quasi identiques entre les deux isoformes, ce qui indique une conformation très conservée, tandis que la position in de LIMK1 écarte davantage l'hélice que celle de LIMK2.

L'ensemble de ces mesures établit une corrélation entre trois éléments, l'orientation de la tyrosine régulatrice, l'état du pont salin catalytique et la position de l'hélice α C. Ces trois marqueurs, mesurés indépendamment, concordent pour les deux isoformes. La tyrosine régulatrice, bien que située à distance du site catalytique, est donc corrélée à la position de l'hélice α C. Cette hélice participant, avec le motif DFG et la boucle d'activation, à la définition de l'état d'activation de la kinase, cette corrélation constitue le point central du mécanisme étudié.

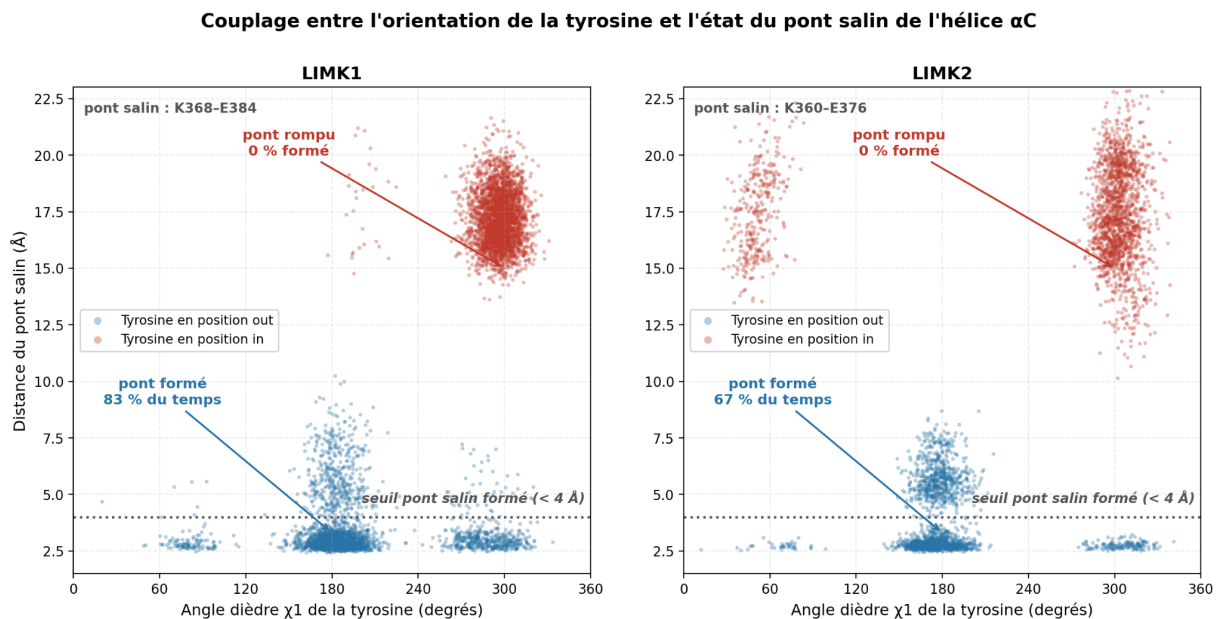


Figure 4 – Deux populations distinctes selon l'orientation de la tyrosine, corrélées à l'état du pont salin, chez LIMK1 et LIMK2. Chaque point représente une conformation échantillonnée au cours des simulations. Lorsque la tyrosine est en position out, le pont salin est formé la majorité du temps. Lorsqu'elle est en position in, il reste rompu.

3.3 Les différences de voisinage de la tyrosine entre les deux orientations

Au-delà de son orientation, la tyrosine régulatrice présente un environnement immédiat qui diffère légèrement selon sa position. Le suivi de la distance entre la tyrosine et le résidu aromatique voisin, une phénylalanine, met en évidence cette différence, sans que cette mesure constitue un critère de caractérisation de la position de l'hélice α C.

Chez LIMK2, la distance entre les cycles aromatiques de la tyrosine et de la phénylalanine voisine est en moyenne de 6,8 angströms lorsque la tyrosine est en position in et de 7,7 angströms lorsqu'elle est en position out. La tyrosine en position in est donc légèrement plus proche de ce résidu, ce qui

est cohérent avec son orientation vers le cœur de la protéine. Toutefois, cette différence, de l'ordre de l'angström, est faible au regard de la dispersion des mesures, dont les écarts types se recouvrent.

Ces observations décrivent un environnement différent selon l'orientation de la tyrosine, cohérent avec le changement de position de sa chaîne latérale, mais elles ne sont pas retenues comme marqueur. La séparation entre les deux orientations y est bien moins nette que pour le pont salin ou la distance entre l'hélice αC et le motif DFG. Les grandeurs employées demeurent l'orientation de la tyrosine, l'état du pont salin et la position de l'hélice αC .

4 L'apport des mutations à la compréhension du mécanisme

L'étude des mutants permet de préciser le rôle des différents groupes chimiques de la tyrosine régulatrice et de comprendre comment son environnement influence la dynamique de la kinase. Trois mutations sont analysées. Les deux premières touchent la tyrosine régulatrice. La substitution en phénylalanine, Y632F, ne modifie pas l'activité des LIM kinases, tandis que la substitution en alanine, Y632A, l'abolit. Sur le plan chimique, la phénylalanine conserve le cycle aromatique de la tyrosine mais supprime le groupe hydroxyle, alors que l'alanine supprime les deux, ce qui permet de distinguer la contribution de chacun de ces éléments à la dynamique de la protéine. La troisième mutation est la substitution de la proline située en aval de l'hélice α C en glutamate. Chaque analyse porte sur les deux isoformes.

4.1 La mutation Y632F rigidifie l'hélice α C

L'analyse des fluctuations par résidu, mesurées par le RMSF après superposition sur l'ensemble de la protéine, révèle l'effet de la mutation de la tyrosine en phénylalanine. Dans les systèmes où la tyrosine est en position out, la flexibilité de l'hélice α C est réduite chez ce mutant. Le RMSF moyen de l'hélice passe de 1,93 angström pour la protéine sauvage à 1,45 angström pour le mutant Y632F. Cette rigidification indique que le groupe hydroxyle de la tyrosine contribue à la souplesse de l'hélice.

La comparaison avec le mutant en alanine précise ce rôle. Le mutant Y632A, qui perd à la fois le cycle aromatique et le groupe hydroxyle, présente un RMSF de 1,89 angström, très proche de celui de la protéine sauvage. Le classement des quatre systèmes lorsque la tyrosine est en position out, du plus rigide au plus souple, est le suivant, Y632F à 1,45 angström, puis le mutant de la proline à 1,62 angström, puis Y632A à 1,89 angström et la protéine sauvage à 1,93 angström. La perte du seul groupe hydroxyle rigidifie donc l'hélice, tandis que la perte simultanée du cycle et du groupe hydroxyle ramène la flexibilité au niveau de la protéine sauvage. Ce résultat indique que le cycle aromatique et le groupe hydroxyle exercent des effets opposés sur la flexibilité de l'hélice, leur suppression conjointe se compensant.

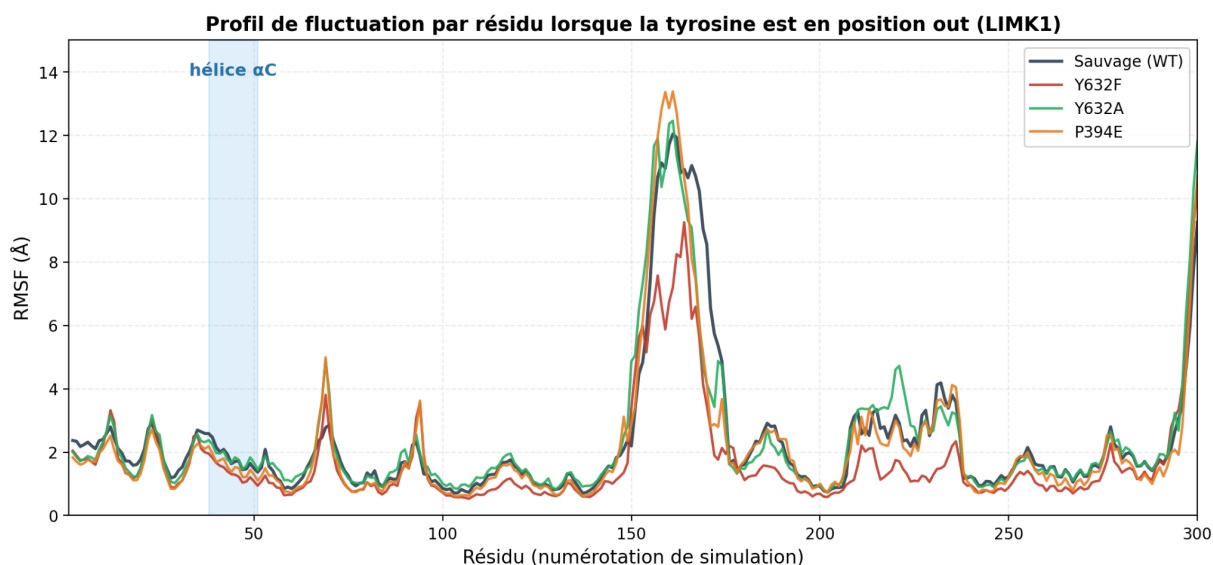


Figure 5 – Profil de fluctuation par résidu lorsque la tyrosine est en position out, pour LIMK1. Les quatre systèmes, sauvage et trois mutants, sont représentés en courbes de RMSF le long de la séquence, la zone de l'hélice α C étant surlignée. Le mutant Y632F présente une hélice α C plus rigide que les autres systèmes.

4.2 Une flexibilité de l'hélice α C qui dépend de l'orientation initiale de la tyrosine

L'effet de la mutation Y632F sur la flexibilité de l'hélice α C dépend de l'orientation initiale de la tyrosine, et s'inverse entre les deux. Lorsque la tyrosine est en position out, le mutant Y632F présente l'hélice la moins mobile de tous les systèmes, à 1,45 angström. Lorsque la tyrosine est en position

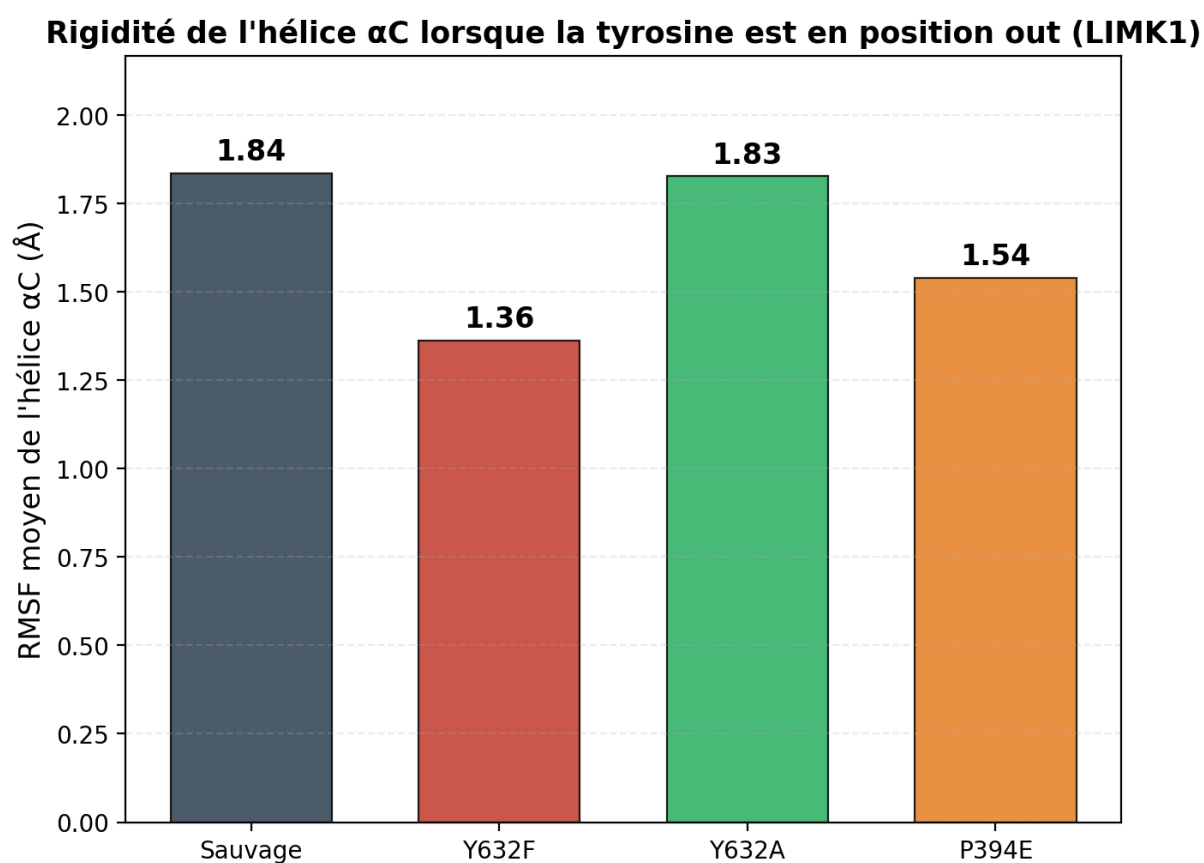


Figure 6 – La suppression du groupe hydroxyle de la tyrosine rigidifie l'hélice α C chez LIMK1. RMSF moyen de l'hélice α C pour la protéine sauvage et les trois mutants, lorsque la tyrosine est en position out. Le mutant Y632F présente l'hélice la plus rigide, tandis que le mutant Y632A, qui perd aussi le cycle aromatique, revient au niveau de la protéine sauvage.

in, ce comportement se renverse, l'hélice de ce même mutant devenant la plus mobile de tous, à 2,23 angström, contre 1,64 angström pour la protéine sauvage.

Cette inversion est propre au mutant Y632F. Les autres systèmes conservent une flexibilité comparable dans les deux cas. La protéine sauvage passe de 1,93 à 1,64 angström, le mutant Y632A de 1,89 à 1,62 angström, et le mutant de la proline reste stable, de 1,62 à 1,59 angström. Seul le mutant Y632F change nettement de comportement selon l'orientation initiale de la tyrosine, ce qui souligne le rôle particulier du groupe hydroxyle dans la dynamique de l'hélice. En son absence, l'hélice se rigidifie lorsque la tyrosine est en position out mais se déstabilise lorsqu'elle est en position in.

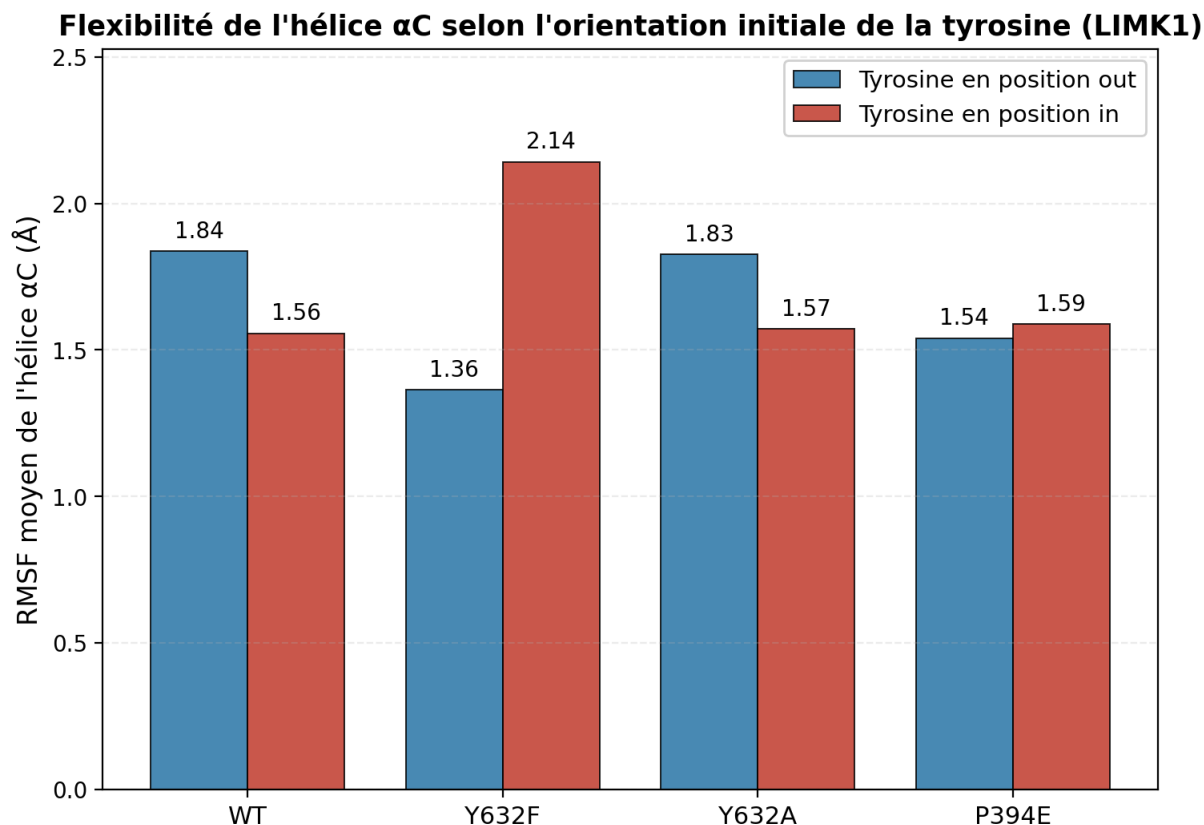


Figure 7 – La flexibilité de l'hélice α C du mutant Y632F s'inverse selon l'orientation initiale de la tyrosine, chez LIMK1. RMSF moyen de l'hélice α C pour la protéine sauvage et les trois mutants, selon que la tyrosine est initiée en position out ou en position in. Seul le mutant Y632F change nettement de comportement, présentant l'hélice la plus rigide lorsque la tyrosine est en position out et la plus mobile lorsqu'elle est en position in.

4.3 P394E et P386E, une action allostérique sur la tyrosine et un lien avec Hsp90

La mutation de la proline en glutamate, P394E chez LIMK1 et P386E chez LIMK2, concerne un résidu situé en aval de l'hélice α C, à distance de la tyrosine régulatrice. Malgré cet éloignement, elle modifie le comportement de la tyrosine. L'effet est net dans les systèmes initiés avec la tyrosine en position out. Alors que la protéine sauvage conserve alors sa tyrosine autour de 182 degrés, orientation out, le mutant P394E voit sa tyrosine se déplacer majoritairement autour de 298 degrés, orientation in. La tyrosine passe ainsi la plus grande partie de la simulation en position in, bien qu'ayant été initiée en position out. Ce comportement se retrouve chez LIMK2, où le mutant P386E déplace également la tyrosine vers la position in.

Un point mérite d'être souligné. Bien que la tyrosine se déplace vers la position in chez ces mutants, le pont salin catalytique reste formé, à 3,38 angström chez P394E et 3,65 angström chez P386E, alors qu'il est rompu lorsque la tyrosine du sauvage est en position in. La mutation de la proline dissocie donc l'orientation de la tyrosine de la position de l'hélice α C. Normalement corrélées, ces deux grandeurs se découpent sous l'effet de la mutation, la tyrosine adoptant la position in tandis que le pont salin

Déplacement de la tyrosine vers la position in sous l'effet de la mutation de la proline

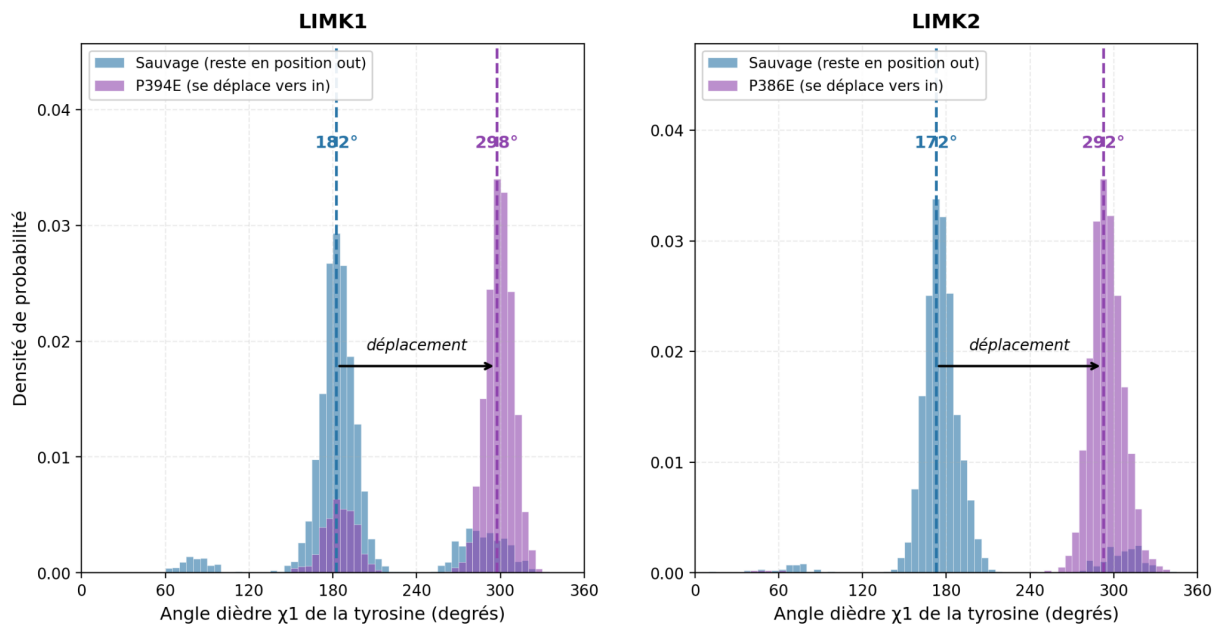


Figure 8 – La mutation de la proline déplace la tyrosine vers la position in chez les deux isoformes. Distribution de l’angle dièdre χ_1 de la tyrosine régulatrice pour la protéine sauvage et le mutant de la proline, tous deux initiés avec la tyrosine en position out. Chez le sauvage, la tyrosine reste en position out, autour de 182 degrés pour LIMK1 et 172 degrés pour LIMK2. Chez le mutant, elle se déplace vers la position in, autour de 298 degrés pour LIMK1 et 292 degrés pour LIMK2.

demeure formé, marqueur d’une hélice αC en position active. Ce découplage est observé de façon identique chez les deux isoformes.

Table 3 – Découplage de l’orientation de la tyrosine et de la position de l’hélice αC chez les mutants de la proline.

Système	Isoforme	Orientation de la tyrosine	Pont salin	Pont formé
Sauvage, tyrosine in	LIMK1	in (298°)	17,18 Å	0 %
P394E, initié out	LIMK1	in (298°)	3,38 Å	79 %
Sauvage, tyrosine in	LIMK2	in (302°)	17,36 Å	0 %
P386E, initié out	LIMK2	in (292°)	3,65 Å	73 %

Ce résidu présente par ailleurs un intérêt particulier. Il est situé dans la boucle qui suit l’hélice αC , région identifiée comme le site de liaison de la protéine chaperonne Hsp90. Des travaux antérieurs ont montré que la mutation de cette proline en glutamate réduit fortement l’association entre LIMK1 et Hsp90. Or la liaison de Hsp90 est nécessaire à l’homodimérisation des LIM kinases et à leur transphosphorylation. Cette mutation, étudiée ici pour son effet sur la dynamique de la tyrosine et de l’hélice αC , correspond donc à une perturbation d’un site fonctionnel important, ce qui établit un lien entre le comportement observé en simulation et le mécanisme de dimérisation examiné dans la partie suivante.

4.4 Traits communs et différences entre les deux isoformes

L’ensemble des analyses fait apparaître des traits communs aux deux isoformes et quelques différences. Le mécanisme central se retrouve chez LIMK1 comme chez LIMK2. La corrélation entre l’orientation de la tyrosine, le pont salin et la position de l’hélice αC est présente dans les deux isoformes. Le déplacement de la tyrosine vers la position in sous l’effet de la mutation de la proline, ainsi

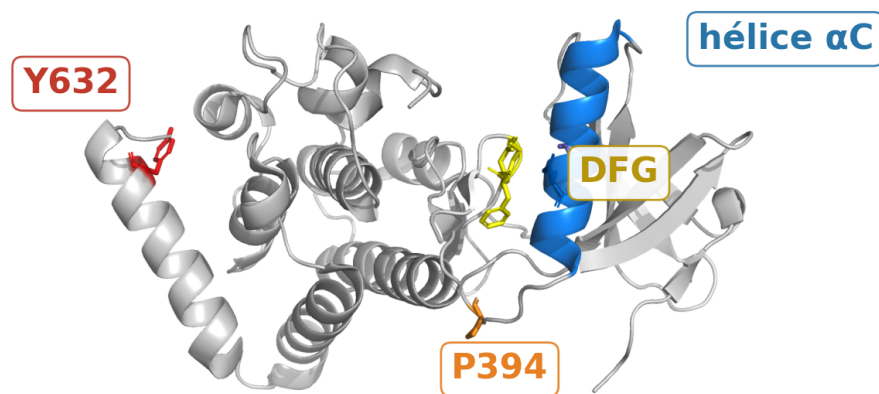


Figure 9 – Localisation de la proline P394 par rapport à l'hélice αC et à la tyrosine régulatrice chez LIMK1. La structure du domaine kinase sous sa forme active, PDB 3S95, montre la tyrosine Y632 en rouge, l'hélice αC en bleu, le motif catalytique DFG en jaune, et la proline P394 en orange. La proline est située dans la boucle qui suit l'hélice αC , région correspondant au site de liaison de la protéine chaperonne Hsp90, à distance de la tyrosine régulatrice.

que le découplage qui l'accompagne, sont également communs aux deux. Ces éléments indiquent que le mécanisme étudié n'est pas propre à une isoforme, mais partagé.

Des différences apparaissent néanmoins dans le comportement dynamique. LIMK2 présente une mobilité globale plus importante que LIMK1. Par ailleurs, l'effet des mutations de la tyrosine sur la flexibilité de l'hélice αC n'a pas exactement la même ampleur chez les deux isoformes. Ces différences relèvent de propriétés propres à chaque isoforme et ne remettent pas en cause le mécanisme commun.

5 Les interfaces de dimérisation et la place de la tyrosine

L'homodimérisation est une étape nécessaire à l'activation des LIM kinases, puisqu'elle permet la transphosphorylation d'un monomère par l'autre. Cette partie examine les interfaces de dimérisation à partir des structures disponibles, afin de préciser leur organisation et de situer la tyrosine régulatrice par rapport à ces interfaces. L'analyse repose sur deux homodimères de LIMK2 issus de la Protein Data Bank, les structures 8S3X et 4TPT, et sur des modèles prédictifs générés avec AlphaFold.

5.1 Deux modes d'association distincts dans les homodimères 8S3X et 4TPT

Les deux structures cristallographiques présentent deux modes d'association différents. Dans la structure 4TPT, les deux monomères s'associent par leurs lobes amino-terminaux, selon une organisation parallèle. Cette association s'accompagne d'un échange de segment entre les deux monomères. Dans la structure 8S3X, les monomères s'associent par leurs lobes carboxy-terminaux, selon une organisation tête-bêche.

Les surfaces enfouies à l'interface diffèrent nettement entre les deux structures. L'interface de 4TPT enfouit une surface de 2280 angströms carrés par face, tandis que celle de 8S3X enfouit 934 angströms carrés par face. L'interface de 4TPT est donc environ deux fois et demie plus étendue que celle de 8S3X. Cette différence doit toutefois être interprétée avec prudence. La grande surface de 4TPT résulte en partie de l'échange de segment entre les monomères, qui augmente la surface de contact sans nécessairement refléter une interface de dimérisation biologique plus stable.

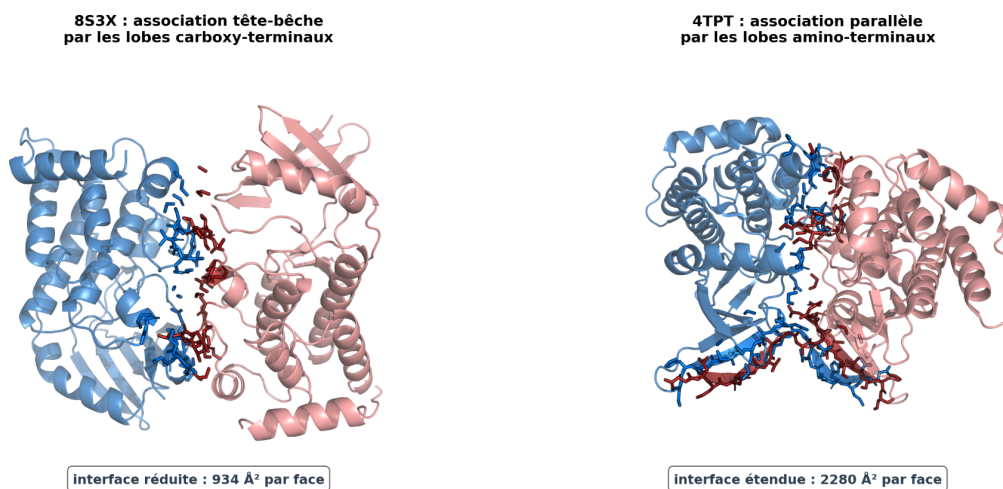


Figure 10 – Deux modes d'association distincts dans les homodimères de LIMK2. Dans la structure 8S3X, les monomères s'associent tête-bêche par leurs lobes carboxy-terminaux, avec une interface réduite de 934 angströms carrés par face. Dans la structure 4TPT, ils s'associent parallèlement par leurs lobes amino-terminaux, avec une interface étendue de 2280 angströms carrés par face. Les deux monomères sont représentés en bleu et saumon, les résidus d'interface, à moins de 5 angströms de l'autre monomère, en bâtons de teinte foncée.

5.2 La tyrosine régulatrice absente des interfaces de dimérisation

La position de la tyrosine régulatrice a été examinée dans les deux structures, afin de déterminer si elle participe directement au contact entre les monomères. La distance entre la tyrosine d'un monomère et l'atome le plus proche du monomère voisin a été mesurée. Dans la structure 4TPT, cette distance est d'environ 19 angströms, ce qui place la tyrosine loin de l'interface. Dans la structure 8S3X, elle est d'environ 9 à 11 angströms, valeur plus faible mais qui demeure au-delà d'un contact direct entre atomes.

Dans les deux structures, la tyrosine régulatrice ne participe donc pas directement à l'interface de dimérisation. Ce constat est important au regard des données fonctionnelles, qui montrent que cette tyrosine est nécessaire à la dimérisation. Plus précisément, la substitution de la tyrosine en alanine

abolit la dimérisation, tandis que sa substitution en phénylalanine la préserve (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience). La nature aromatique de la tyrosine est donc requise pour la dimérisation. Comme la tyrosine n'est pas présente à l'interface, son rôle dans la dimérisation ne peut pas s'expliquer par une participation directe, ce qui oriente vers un rôle indirect, examiné plus loin.

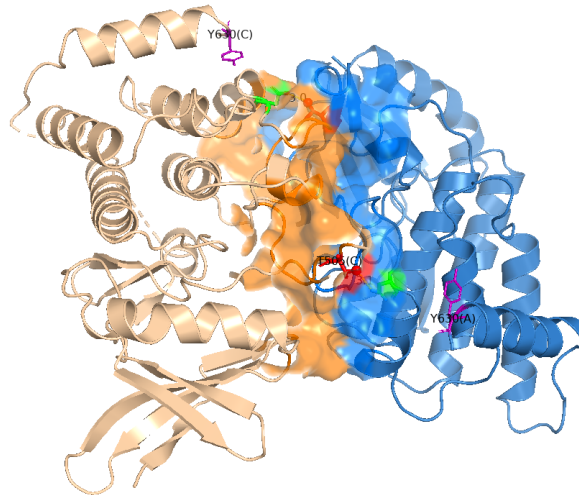


Figure 11 – Position de la tyrosine régulatrice par rapport à l'interface de dimérisation. Pour chaque structure, la tyrosine est mise en évidence sur chaque monomère, avec la distance au monomère voisin indiquée. La tyrosine est éloignée de l'interface dans les deux structures.

5.3 Des sites de transphosphorylation éloignés du site catalytique opposé

La transphosphorylation suppose qu'un site phosphorylable d'un monomère se trouve à proximité du site catalytique de l'autre monomère. Pour qu'un transfert de phosphate soit géométriquement possible, cette distance doit être de l'ordre de 8 angströms ou moins. Les distances entre les sites phosphorylables de la région carboxy-terminale et l'aspartate catalytique du monomère opposé ont été mesurées dans les deux structures.

Trois sites phosphorylables sont résolus dans les structures, les résidus T625, S627 et Y630. Les deux autres sites de cette région, T633 et S636, ne sont pas résolus et n'ont pas pu être analysés. Les distances mesurées sont toutes très supérieures au seuil requis. Dans la structure 4TPT, elles vont de 30 angströms pour Y630 à 40 angströms pour T625. Dans la structure 8S3X, elles vont de 27 angströms pour Y630 à 37 angströms pour T625. Aucune des deux structures ne présente donc une géométrie compatible avec une transphosphorylation directe entre les deux monomères.

Ce résultat indique que les interfaces observées dans ces structures cristallographiques ne correspondent pas à un assemblage permettant la transphosphorylation. Un tel assemblage suppose une organisation différente des monomères, vraisemblablement assistée par la protéine chaperonne Hsp90, qui n'est pas représentée dans ces structures.

5.4 L'absence d'interface prédite entre domaines kinases isolés

En complément des structures cristallographiques, des modèles d'homodimère ont été générés avec AlphaFold pour les deux isoformes, afin d'évaluer si une interface de dimérisation entre domaines kinases peut être prédite. Deux prédictions sont présentées ici, l'une sur la séquence entière de LIMK1, l'autre sur le domaine kinase isolé de LIMK2.

Table 4 – Distances entre les sites de transphosphorylation et le site catalytique opposé. Pour chaque site phosphorylable résolu, T625, S627 et Y630, sa distance à l’aspartate catalytique du monomère opposé dans les deux structures, comparée au seuil de 8 angströms requis.

Site phosphorylable	Distance dans 4TPT	Distance dans 8S3X
T625	40 Å	37 Å
S627	37 Å	32 Å
Y630	30 Å	27 Å
Seuil requis pour la transphosphorylation	moins de 8 Å	moins de 8 Å

Les scores de confiance des interfaces sont faibles dans les deux cas. Pour la séquence entière de LIMK1, le score ipTM, qui évalue la qualité de l’interface entre les chaînes, est de 0,42 sur les cinq modèles générés. Seule une très faible proportion des contacts entre les deux chaînes, environ 0,5 pour cent, est prédite de façon fiable, et ces contacts se situent dans la région des domaines LIM et PDZ, en dehors du domaine kinase. Pour le domaine kinase isolé de LIMK2, le score ipTM est encore plus faible, entre 0,08 et 0,17 selon les modèles, alors que chaque monomère est correctement replié, avec un score pTM de 0,48. L’erreur de position prédite entre les deux chaînes est élevée, en moyenne 28 angströms, ce qui traduit une absence de positionnement défini entre les deux monomères.

Ces résultats indiquent qu’AlphaFold ne prédit aucune interface de dimérisation fiable impliquant le domaine kinase, que ce soit sur la séquence entière ou sur le domaine isolé. Ce constat est cohérent avec le caractère monomérique du domaine kinase en solution (Salah et al., 2019) et avec la dépendance de la dimérisation vis-à-vis de la protéine chaperonne Hsp90.

Table 5 – Scores de confiance des modèles d’homodimère prédits par AlphaFold. Pour chaque prédiction, séquence entière de LIMK1 et domaine kinase de LIMK2, les scores ipTM et pTM, l’erreur de position inter-chaînes, et la qualité de l’interface.

Prédiction	ipTM	pTM	Erreur de position inter-chaînes	Interface fiable
LIMK1, séquence entière	0,42	0,42	26 Å	0,5 % des contacts, hors du domaine kinase
LIMK2, domaine kinase	0,17	0,48	28 Å	aucune

5.5 Un rôle possible de la tyrosine dans la dimérisation par l’intermédiaire de l’hélice α C

Les résultats précédents dessinent une situation à première vue paradoxale. La tyrosine régulatrice est nécessaire à la dimérisation, sa substitution en alanine abolissant celle-ci, tandis que sa substitution en phénylalanine la préserve (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience). Pourtant, cette tyrosine n’est pas présente aux interfaces de dimérisation observées, et aucune interface fiable entre domaines kinases n’est prédite. Son rôle dans la dimérisation ne peut donc pas être direct.

Une explication cohérente avec l’ensemble des résultats est que la tyrosine agit sur la dimérisation de façon indirecte, par l’intermédiaire de l’hélice α C. Les analyses des parties précédentes ont montré que l’orientation de la tyrosine est corrélée à la position de l’hélice α C. La nature aromatique de la tyrosine, seule requise pour la dimérisation, est aussi celle qui gouverne le comportement de cette hélice. Ce parallèle suggère que la tyrosine conditionne la dimérisation en agissant sur la conformation de l’hélice α C.

Ce modèle rejoint un mécanisme connu chez d’autres kinases. Chez le récepteur EGFR et chez B-Raf, l’hélice α C participe à l’interface de dimérisation, et la dimérisation par cette hélice contribue

à l'activation de la kinase (Zhang et al., 2006 ; Rajakulendran et al., 2009). Par analogie, l'hélice αC des LIM kinases pourrait médier leur dimérisation, la conformation de cette hélice étant conditionnée par l'orientation de la tyrosine régulatrice. Cette hypothèse est renforcée par le comportement de la mutation de la proline, qui agit sur la dynamique de l'hélice αC et perturbe l'association avec la protéine chaperonne Hsp90, elle-même nécessaire à la dimérisation.

L'ensemble de ces observations permet de proposer un enchaînement cohérent. La tyrosine régulatrice, par son cycle aromatique, agit sur la conformation de l'hélice αC . Cette hélice conditionne la capacité de la kinase à dimériser, directement ou par l'intermédiaire de Hsp90. La dimérisation permet ensuite la transphosphorylation, prérequis à l'activation par les kinases en amont et à l'activité sur la cofiline. Dans ce schéma, la tyrosine ne participe pas à l'interface, mais agit, par l'intermédiaire de l'hélice αC , sur l'état conformationnel qui rend la dimérisation possible. Cette hypothèse relie les observations de dynamique moléculaire au mécanisme fonctionnel des LIM kinases et constitue une piste à approfondir.

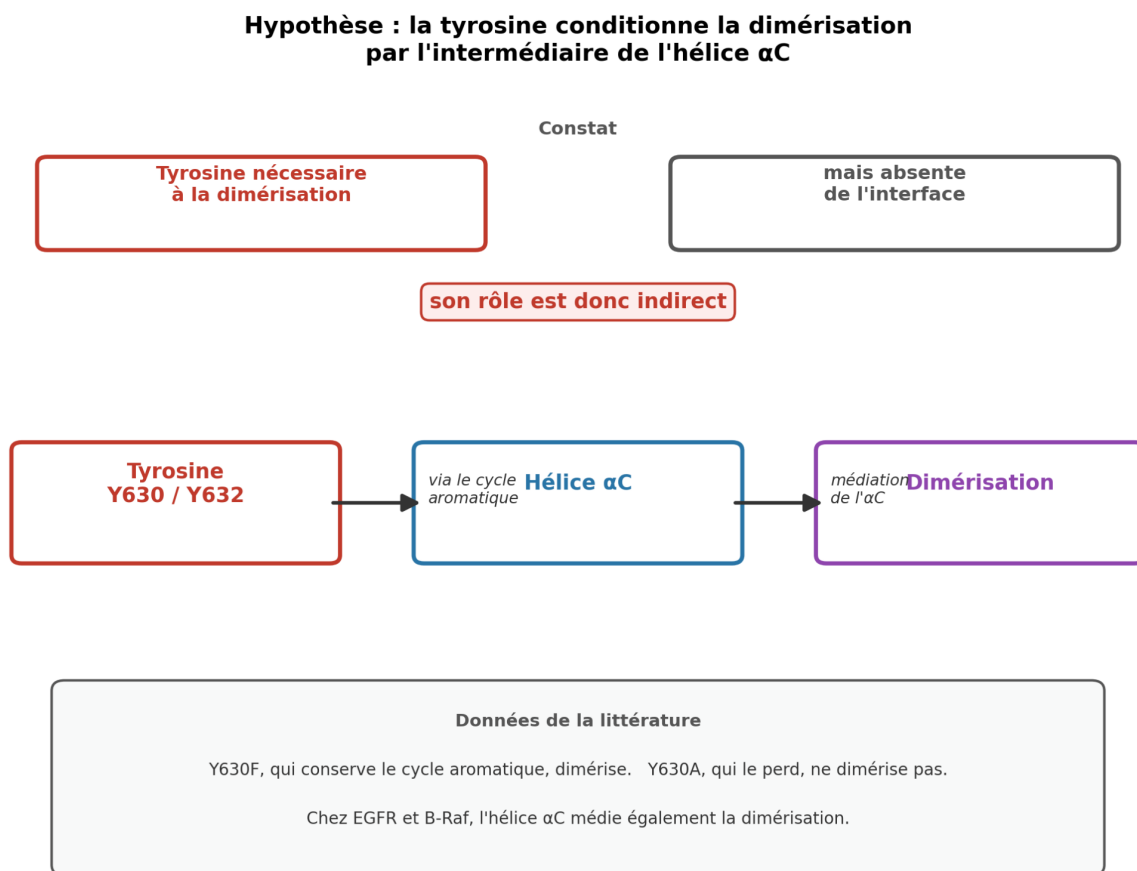


Figure 12 – Hypothèse du rôle indirect de la tyrosine dans la dimérisation par l'intermédiaire de l'hélice αC . Schéma conceptuel reliant l'orientation de la tyrosine, la conformation de l'hélice αC , et la compétence pour la dimérisation ou la liaison de Hsp90.

Discussion

5.6 Un couplage entre l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice αC , commun aux deux isoformes

Le premier apport de ce travail est d'avoir caractérisé, par la dynamique moléculaire, la corrélation entre l'orientation de la tyrosine régulatrice et la position de l'hélice αC . Trois marqueurs mesurés indépendamment, l'angle χ_1 de la tyrosine, l'état du pont salin catalytique et la distance entre l'hélice αC et le motif DFG, concordent. Lorsque la tyrosine est en position out, le pont salin est formé et

l'hélice αC occupe sa position active. Lorsque la tyrosine est en position in, le pont salin est rompu et l'hélice s'en écarte.

Cette corrélation a été retrouvée chez LIMK1 et chez LIMK2. Sa présence dans les deux isoformes indique qu'elle relève d'une propriété partagée du domaine kinase, et non d'une particularité de l'une d'elles. Ce résultat est cohérent avec les observations issues des structures cristallographiques, où la même corrélation avait été relevée.

6 Discussion

6.1 Un couplage entre l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice α C, commun aux deux isoformes

Le premier apport de ce travail est d'avoir caractérisé, par la dynamique moléculaire, la corrélation entre l'orientation de la tyrosine régulatrice et la position de l'hélice α C. Trois marqueurs mesurés indépendamment, l'angle χ_1 de la tyrosine, l'état du pont salin catalytique et la distance entre l'hélice α C et le motif DFG, concordent. Lorsque la tyrosine est en position out, le pont salin est formé et l'hélice α C occupe sa position active. Lorsque la tyrosine est en position in, le pont salin est rompu et l'hélice s'en écarte.

Cette corrélation a été retrouvée chez LIMK1 et chez LIMK2. Sa présence dans les deux isoformes indique qu'elle relève d'une propriété partagée du domaine kinase, et non d'une particularité de l'une d'elles. Ce résultat est cohérent avec les observations issues des structures cristallographiques, où la même corrélation avait été relevée.

Il convient de rester mesuré sur la portée de cette observation. Les simulations montrent une corrélation entre deux grandeurs, l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice α C. Elles n'établissent pas de relation de cause à effet. La tyrosine est un observable situé à distance du site catalytique, dont l'orientation accompagne la position de l'hélice α C, cette dernière participant, avec le motif DFG et la boucle d'activation, à la définition de l'état d'activation de la kinase. Les simulations ne permettent pas d'affirmer que la tyrosine gouverne cette position, seulement qu'elle lui est associée.

6.2 L'apport des mutations à la compréhension du rôle de la tyrosine

L'étude des mutants a précisé le rôle des groupes chimiques de la tyrosine. La comparaison des substitutions en phénylalanine et en alanine a montré que le groupe hydroxyle et le cycle aromatique exercent des effets opposés sur la flexibilité de l'hélice α C. La suppression du seul groupe hydroxyle, dans le mutant Y632F, rigidifie l'hélice. La suppression simultanée du cycle et du groupe hydroxyle, dans le mutant Y632A, ramène la flexibilité au niveau de la protéine sauvage. Ces effets se compensent, ce qui suggère une contribution distincte de chacun de ces éléments à la dynamique de l'hélice.

Ce résultat prend un sens particulier au regard des données fonctionnelles. La substitution en phénylalanine ne modifie pas l'activité des LIM kinases, tandis que la substitution en alanine l'abolit. La différence de comportement dynamique observée entre ces deux mutants offre une piste pour relier la nature chimique de la tyrosine à son rôle fonctionnel, sans qu'un lien direct puisse être établi à ce stade.

La mutation de la proline en aval de l'hélice α C a mis en évidence une action à distance. Bien que ce résidu soit éloigné de la tyrosine, sa substitution déplace la tyrosine vers la position in dans les systèmes initiés en position out, chez les deux isoformes. Ce déplacement s'accompagne d'un découplage. La tyrosine adopte la position in, mais le pont salin reste formé, marqueur d'une hélice α C en position active. Ce découplage montre que l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice α C, normalement corrélées, peuvent être dissociées par une perturbation distante. Il souligne que la corrélation observée n'est pas une contrainte géométrique rigide, mais une relation qui peut être modulée.

Ce résidu correspond par ailleurs à la région de liaison de la protéine chaperonne Hsp90 (Li et al., 2006). La perturbation de cette région par la mutation relie le comportement observé en simulation à un site fonctionnel important, ce qui sera discuté plus loin dans le cadre de la dimérisation.

6.3 La place de la tyrosine dans la dimérisation

L'analyse des interfaces de dimérisation a conduit à un constat clair. Dans les deux structures d'homodimère examinées, la tyrosine régulatrice n'est pas présente à l'interface. Les distances mesurées entre les sites de transphosphorylation et le site catalytique du monomère opposé sont toutes très supérieures au seuil compatible avec un transfert de phosphate. Par ailleurs, aucune interface de dimérisation fiable entre domaines kinases n'a été prédite par AlphaFold, ni sur la séquence entière de LIMK1, ni sur le domaine kinase de LIMK2.

Ces observations dessinent une situation à première vue paradoxale. Les données fonctionnelles indiquent que la tyrosine est nécessaire à la dimérisation, sa substitution en alanine l’abolissant (Villalonga-Rosso et al., 2026, soumis à iScience). Pourtant, la tyrosine n’est pas présente aux interfaces observées. Son rôle dans la dimérisation ne peut donc pas s’expliquer par une participation directe.

Une hypothèse cohérente avec l’ensemble de ces résultats est que la tyrosine agirait sur la dimérisation de façon indirecte, par l’intermédiaire de l’hélice α C. Chez d’autres kinases, comme le récepteur EGFR et B-Raf, l’hélice α C participe à l’interface de dimérisation (Zhang et al., 2006 ; Rajakulendran et al., 2009). Par analogie, l’hélice α C des LIM kinases pourrait médier leur dimérisation, sa conformation étant conditionnée par l’orientation de la tyrosine régulatrice. Cette hypothèse relie les observations de dynamique aux données fonctionnelles.

Il faut toutefois souligner le caractère hypothétique de cette proposition. Elle repose sur une analogie avec d’autres kinases et sur la corrélation entre la tyrosine et l’hélice α C observée dans ce travail. Elle n’est pas démontrée directement pour les LIM kinases. Sa validation nécessiterait des travaux complémentaires, notamment l’étude de la dynamique des interfaces de dimérisation, qui n’a pas été abordée ici.

6.4 Limites du travail

Plusieurs limites doivent être signalées, car elles conditionnent la portée des résultats.

La première concerne la boucle d’activation. Dans les structures de départ, cette boucle était partiellement non résolue et a été reconstruite par modélisation par homologie. Son comportement dynamique dans les simulations doit donc être interprété avec prudence, car il dépend en partie de la reconstruction initiale. Pour cette raison, les résultats relatifs à la flexibilité de la boucle d’activation n’ont pas été retenus comme conclusions dans ce travail.

La deuxième concerne l’analyse des interfaces de dimérisation. Cette analyse a été menée sur les structures cristallographiques et les modèles prédictifs, de façon statique. Elle n’a pas comporté de simulations de dynamique moléculaire des interfaces elles-mêmes. La stabilité de ces interfaces au cours du temps n’a donc pas été évaluée, et les conclusions sur la dimérisation restent limitées à une analyse structurale.

La troisième concerne les durées de simulation. Les systèmes de LIMK1 ont été prolongés jusqu’à trois microsecondes, tandis que ceux de LIMK2 ont été analysés sur deux microsecondes. Cette différence de durée doit être prise en compte dans la comparaison entre isoformes, même si les comportements observés se sont montrés cohérents entre les deux.

Enfin, l’analyse par réseau d’interactions, qui aurait permis d’identifier plus précisément les résidus reliant la tyrosine à l’hélice α C et au motif DFG, n’a pas pu être menée à terme. Elle est présentée en perspective.

6.5 Perspectives

Ce travail ouvre plusieurs pistes.

La première serait de mener l’analyse par réseau d’interactions. Cette approche, mise en œuvre par l’outil SenseNet à partir des trajectoires, permettrait de caractériser les chemins d’interactions reliant la tyrosine régulatrice à l’hélice α C et au motif DFG. La comparaison des réseaux entre les positions out et in identifierait les résidus dont le rôle change selon l’orientation de la tyrosine. Cette analyse préciserait, au niveau des résidus, le support structural de la corrélation observée dans ce travail. Sa mise en œuvre a été initiée mais n’a pas pu être conduite jusqu’à son terme.

La deuxième serait d’étudier la dynamique des interfaces de dimérisation par simulation. Des simulations des homodimères permettraient d’évaluer la stabilité des interfaces observées dans les structures cristallographiques, et de préciser si elles correspondent à des assemblages stables ou transitoires. Elles complèteraient l’analyse structurale menée ici et affineraient les hypothèses sur le mécanisme de transphosphorylation.

La troisième serait de prolonger les simulations de LIMK2 jusqu’à trois microsecondes, afin de disposer de durées comparables entre les deux isoformes et de confirmer les comportements observés.

Enfin, la validation de l'hypothèse d'un rôle indirect de la tyrosine dans la dimérisation, par l'intermédiaire de l'hélice αC , constituerait un prolongement naturel de ce travail. Elle pourrait s'appuyer sur l'étude conjointe de la dynamique de l'hélice αC et de la compétence à la dimérisation, chez la protéine sauvage et les mutants.

Conclusion

Ce travail avait pour objectif de mieux comprendre le rôle d'une tyrosine régulatrice, située à l'extrémité du domaine kinase des LIM kinases, dans la régulation de ces enzymes. Deux questions étaient posées, la relation entre cette tyrosine et l'hélice αC du site catalytique, et la place de cette tyrosine dans l'homodimérisation nécessaire à l'activation. Ces questions ont été abordées par la simulation de dynamique moléculaire et par l'analyse structurale des interfaces de dimérisation, sur les deux isoformes LIMK1 et LIMK2.

L'analyse des trajectoires a établi une corrélation entre l'orientation de la tyrosine régulatrice et la position de l'hélice αC . Trois marqueurs mesurés indépendamment, l'angle dièdre de la tyrosine, l'état du pont salin catalytique et la distance entre l'hélice αC et le motif DFG, concordent. Cette corrélation a été retrouvée chez les deux isoformes, ce qui indique qu'elle relève d'une propriété partagée du domaine kinase. Ces simulations montrent une association entre l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice αC , sans établir de relation de cause à effet, l'hélice participant, avec le motif DFG et la boucle d'activation, à la définition de l'état d'activation.

L'étude des mutants a précisé le rôle des groupes chimiques de la tyrosine. La comparaison des substitutions en phénylalanine et en alanine a montré que le cycle aromatique et le groupe hydroxyle exercent des effets opposés sur la flexibilité de l'hélice αC . La mutation de la proline située en aval de l'hélice, bien qu'éloignée de la tyrosine, déplace celle-ci vers la position in, tout en maintenant le pont salin formé. Ce découplage montre que la corrélation entre l'orientation de la tyrosine et la position de l'hélice αC peut être dissociée par une perturbation distante.

L'analyse des interfaces de dimérisation a montré que la tyrosine régulatrice n'est pas présente aux interfaces des structures d'homodimères examinées, et qu'aucune interface fiable entre domaines kinases n'est prédite. La tyrosine étant néanmoins nécessaire à la dimérisation, son rôle ne peut être direct. Ces observations ont conduit à proposer une hypothèse, celle d'un rôle indirect de la tyrosine, agissant sur la dimérisation par l'intermédiaire de l'hélice αC , par analogie avec d'autres kinases. Cette hypothèse relie les observations de dynamique aux données fonctionnelles, mais reste à démontrer.

Ce travail a ainsi caractérisé un couplage conservé entre la tyrosine régulatrice et l'hélice αC , et proposé une piste pour comprendre le rôle de cette tyrosine dans la dimérisation. Plusieurs prolongements permettraient d'aller plus loin. L'analyse par réseau d'interactions préciserait, au niveau des résidus, le support structural de la corrélation observée. L'étude par simulation de la dynamique des interfaces de dimérisation évaluerait leur stabilité et affinerait les hypothèses sur la transphosphorylation. Enfin, la validation directe de l'hypothèse d'un rôle indirect de la tyrosine, par l'intermédiaire de l'hélice αC , constituerait un prolongement naturel de ce travail. En reliant la dynamique du domaine kinase à la question de la dimérisation, cette étude apporte des éléments de compréhension du mécanisme de régulation des LIM kinases, dont plusieurs aspects restent à explorer.

Bibliographie

- [1] Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(6), 1071–1076.
- [2] 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. *Nature Cell Biology*, 1(5), 253–259.
- [3] Li, R., Soosairajah, J., Harari, D., Citri, A., Price, J. T., Ng, H. L., Morton, C. J., Parker, M. W., Yarden, Y., & Bernard, O. (2006). Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homo-dimerization. *The FASEB Journal*, 20(8), 1218–1220. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5258fje>
- [4] Manetti, F. (2012). LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Medicinal Research Reviews*, 32(5), 968–998.
- [5] Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W. Y., MacDonald, J. F., Wang, J. Y., Falls, D. L., & Jia, Z. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, 35(1), 121–133.
- [6] Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., & Mizuno, K. (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3577–3582.
- [7] Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrançois, M., Sicheri, F., & Therrien, M. (2009). A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*, 461(7263), 542–545.
- [8] Salah, E., Chatterjee, D., Beltrami, A., Tumber, A., Preuss, F., Canning, P., Chaikuad, A., Knaus, P., Knapp, S., Bullock, A. N., & Mathea, S. (2019). Lessons from LIMK1 enzymology and their impact on inhibitor design. *Biochemical Journal*, 476(21), 3197–3209. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190517>
- [9] Villalonga-Rosso, E., Serrano, A., Gonçalves, C., Aci-Sèche, S., Cassas, D., Chalal, C., Žunar, B., Doudeau, M., Mosrin, C., Godin, F., Bonnet, P., Bénédicti, H., & Vallée, B. (2026). A new mechanism of regulation of LIM kinases, LIMK1 and LIMK2, modulates their activity on cofilin and actin filament remodelling. *bioRxiv* (soumis à *iScience*). <https://www.biorxiv.org/content/10.64898/2026.06.23.733925v1>
- [10] Villalonga-Rosso, E. (2024). *Étude des mécanismes moléculaires de régulation des LIM kinases*. Thèse de doctorat, Université d'Orléans.
- [11] Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., & Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125(6), 1137–1149.

Toutes les références ci-dessus ont été vérifiées par recherche en ligne le 25 août 2026 : titre, revue, volume et pages recoupés avec PubMed/l'éditeur. La référence à l'article de l'équipe a pu être identifiée comme une prépublication bioRxiv réelle, déposée le 25 juin 2026, et non un simple manuscrit en préparation. La référence sur LIMK comme cible thérapeutique (initialement "Prudent & Vallée", puis deux propositions de repli "Prudent & Morris, 2014" et "Chatterjee et al., 2022, Oncogene") n'a pu être confirmée sous aucune de ces trois formes malgré recherche ; Manetti (2012), déjà vérifiée ci-dessus, couvre directement ce point et est citée à sa place.

Annexes

Annexe 1. Protocole détaillé de simulation

Structures de départ. Quatorze structures ont été récupérées de la RCSB PDB et superposées avec l'outil MatchMaker de Chimera (identifiants PDB : 3S95, 4TPT, 5HVJ, 5HVK, 5L6W, 5NXC, 5NXD, 7ATU, 7ATS, 7B8W, 7QHG, 8AAU, 8S3X, 8WSW). Deux structures représentatives, une par état conformationnel de la tyrosine régulatrice (3S95 pour Y632-out, 5NXC pour Y632-in), ont servi de base aux systèmes simulés ; leurs résidus manquants ont été modélisés par homologie avec Modeller version 10.4, en utilisant la structure 5HVK comme matrice.

Préparation du système. L'état de protonation à pH 7,4 a été déterminé avec PROPKA version 3.5.1. La topologie a été générée avec AmberTools 24 et le champ de force ff19SB. Chaque système a été solvaté dans une boîte d'eau OPC rectangulaire, avec une distance d'au moins 12 Å entre le soluté et le bord de la boîte, puis neutralisé par des contre-ions à une concentration de 0,15 M.

Minimisation. Trois cycles de 2000 pas chacun, appliqués successivement au solvant, puis au soluté, puis à l'ensemble du système. L'algorithme SHAKE a été utilisé avec un pas d'intégration de 2 fs.

Chauffage et équilibration. Chauffage en ensemble NVT de 0 à 300 K sur 20 ps, par dynamique de Langevin (fréquence de collision 2 ps^{-1}), avec une contrainte de position harmonique sur le soluté. Les interactions électrostatiques à longue portée ont été traitées par la méthode PME, avec un rayon de coupure de 10 Å. Une première équilibration de 30 ps a suivi, avec une diminution progressive de la contrainte harmonique de 10 à $1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$, puis une seconde équilibration de 1 ns en ensemble NPT à 300 K et 1 atm.

Production. Les simulations de production ont été conduites avec le module PMEMD.cuda du programme AMBER20, sur 2 μs par système, avec sauvegarde des coordonnées toutes les nanosecondes.

Annexe 2. Paramètres géométriques suivis

Table A1 – Récapitulatif des paramètres géométriques et de leur définition.

Paramètre	Définition	Ce qu'il mesure
Angle dièdre χ_1	Angle de rotation de la chaîne latérale de la tyrosine	Orientation de la tyrosine, out ou in
Pont salin catalytique	Distance entre la lysine catalytique et le glutamate de l' αC	Formation ou rupture du pont salin, position de l' αC
Distance αC -DFG	Distance entre l'hélice αC et le motif DFG	Position de l'hélice par rapport au site catalytique
RMSD	Déviations de la structure par rapport à une référence	Stabilité globale
RMSF par résidu	Amplitude des mouvements de chaque résidu	Flexibilité locale
Voisinage aromatique	Distance entre la tyrosine et la phénylalanine voisine	Environnement de la tyrosine, descriptif

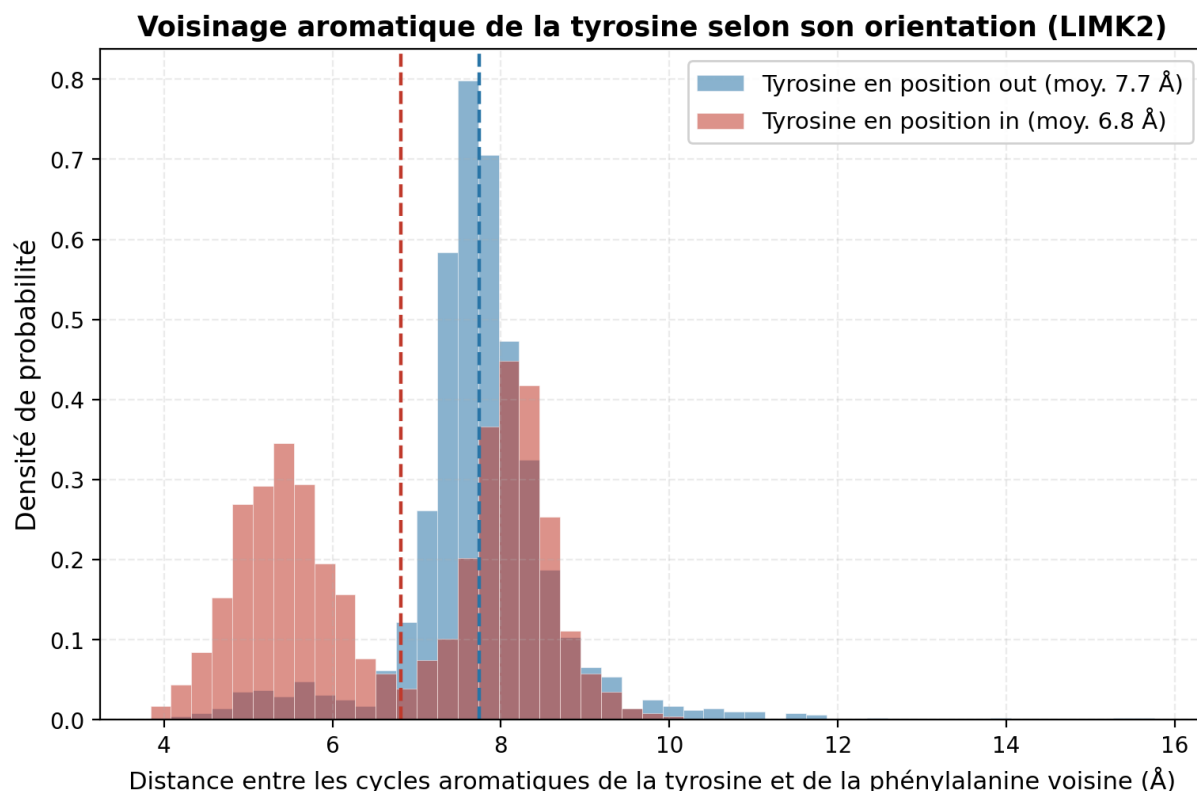


Figure A1 – Une différence de voisinage aromatique faible et non discriminante entre les deux orientations de la tyrosine. Distances entre la tyrosine régulatrice et la phénylalanine voisine, pour les deux orientations, chez LIMK2. La différence, de l'ordre de l'angström, est faible au regard de la dispersion des mesures.

Table A2 – Découplage de l'orientation de la tyrosine et de la position de l'hélice αC chez les mutants de la proline, version complète incluant les systèmes sauvages en position out.

Système	Isoforme	Orientation de la tyrosine (pic de χ_1)	Distance du pont salin	Pont formé
Sauvage, initié en position out	LIMK1	out (182°)	3,40 Å	83 %
Sauvage, initié en position in	LIMK1	in (298°)	17,18 Å	0 %
P394E, initié en position out	LIMK1	in (298°)	3,38 Å	79 %
Sauvage, initié en position out	LIMK2	out (172°)	3,77 Å	67 %
Sauvage, initié en position in	LIMK2	in (302°)	17,36 Å	0 %
P386E, initié en position out	LIMK2	in (292°)	3,65 Å	73 %

Table A3 – Caractéristiques des interfaces de dimérisation des homodimères de LIMK2.

Structure	Mode d'association	Lobes impliqués	Surface enfouie par face
8S3X	tête-bêche	lobes carboxy-terminaux	934 Å ²
4TPT	parallèle, avec échange de segment	lobes amino-terminaux	2280 Å ²

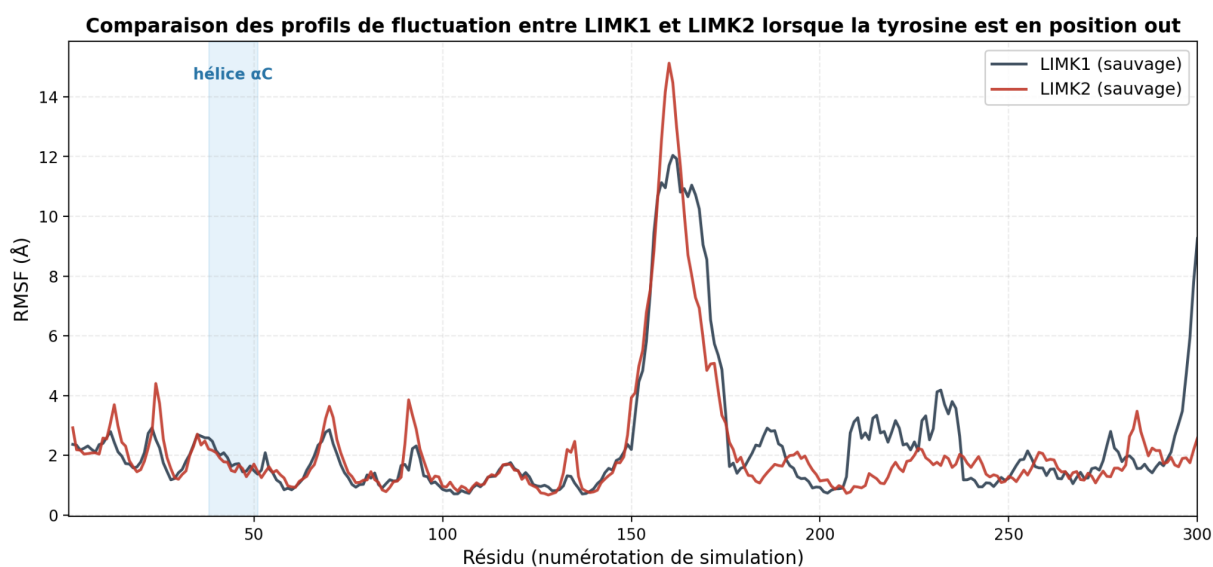


Figure A2 – Comparaison du profil de fluctuation par résidu entre LIMK1 et LIMK2 lorsque la tyrosine est en position out. Les profils de RMSF des deux isoformes sont présentés pour la protéine sauvage et les mutants. LIMK2 présente une mobilité globale plus élevée que LIMK1.

Annexe 3. Voisinage de la tyrosine

Annexe 4. Découplage complet chez les mutants de la proline

Annexe 5. Comparaison des profils RMSF entre isoformes

Annexe 6. Caractéristiques des interfaces de dimérisation

Annexe 7. Mécanisme d'activation des LIM kinases (schéma de synthèse)

Note : les anciennes Annexes 7 (« Distances de transphosphorylation ») et 8 (« Scores AlphaFold ») ont été supprimées de cette version. Leur contenu était strictement identique, cellule pour cellule, aux Tableaux 4 et 5 du corps du mémoire (section 5) et constituait donc une redondance pure, sans information supplémentaire.

Mécanisme d'activation des LIM kinases

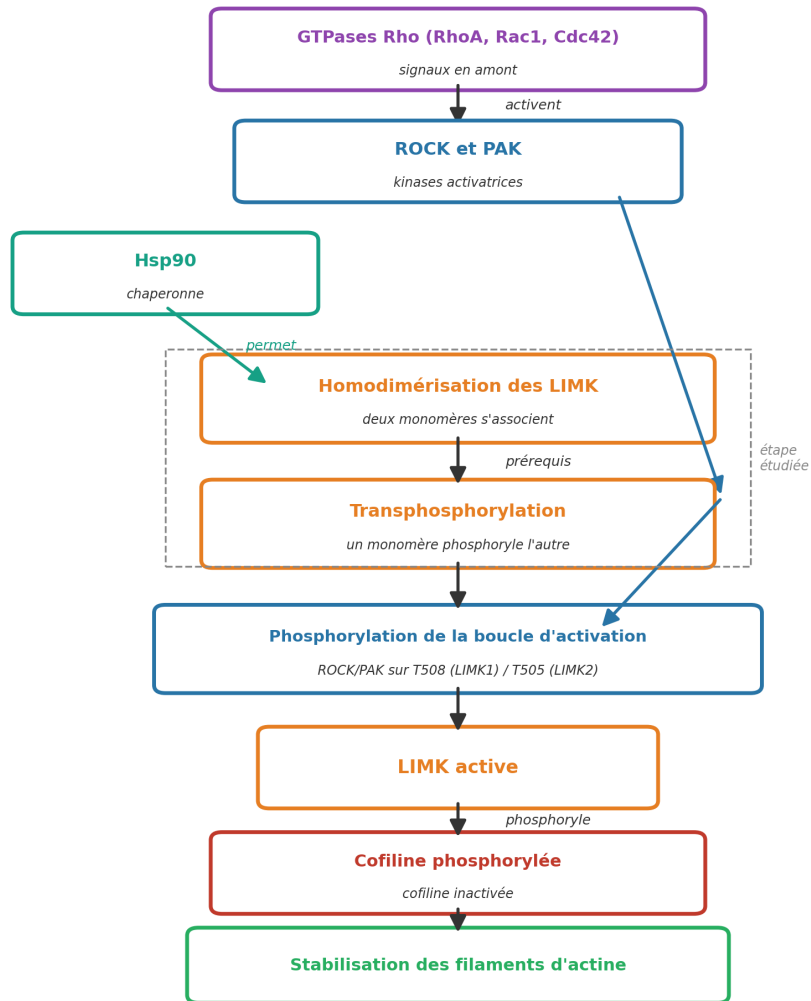


Figure A3 – Mécanisme d'activation des LIM kinases. La phosphorylation de la boucle d'activation par ROCK et PAK et l'homodimérisation, favorisée par la protéine chaperonne Hsp90, concourent à l'activation de la kinase, qui phosphoryle alors la cofiline et stabilise les filaments d'actine. L'étape étudiée dans ce travail, l'homodimérisation suivie de la transphosphorylation, est encadrée.