



HAL
open science

Caractérisation biochimique des phospholipases D et de leurs domaines fonctionnels : nouvelle méthode de mesure de l'activité phospholipase D

Renaud Rahier-Corticchiato

► **To cite this version:**

Renaud Rahier-Corticchiato. Caractérisation biochimique des phospholipases D et de leurs domaines fonctionnels : nouvelle méthode de mesure de l'activité phospholipase D. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1292 . tel-01515321

HAL Id: tel-01515321

<https://theses.hal.science/tel-01515321>

Submitted on 27 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : 2016LYSE1292

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biochimie

Soutenue publiquement le 14/12/2016, par :
Renaud RAHIER-CORTICCHIATO

Caractérisation biochimique des phospholipases D et de leurs domaines fonctionnels.

Nouvelle méthode de mesure de l'activité phospholipase D.

Devant le jury composé de :

GIRARD-EGROT Agnès,
BERTI Liliane,
CARRIERE Frédéric,
KLYMCHENKO Andrey,
ABOUSALHAM Abdelkarim,
NOIRIEL Alexandre,

Professeure, Université Lyon 1
Professeure, Université de Corse
Directeur de Recherche CNRS, Université d'Aix-Marseille
Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg
Professeur, Université Lyon 1
Maître de Conférences, Université Lyon 1

Présidente
Rapporteuse
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Co-encadrant de thèse

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire Métabolisme, Enzymes et Mécanismes Moléculaires (MEM²) à l'Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS – UMR 5246 CNRS) - Université Lyon 1, sous la direction du Pr. Abdelkarim ABOUSALHAM et le co-encadrement du Dr. Alexandre NOIRIEL, dans le cadre d'une allocation de recherche du Ministère de l'Éducation Nationale.

Here's to the ones who see things differently. You can quote them, disagree with them, glorify or vilify them. About the only thing you cannot do is ignore them. Because they change things, they invent, they imagine, they heal, they explore, they create, they inspire, they push the human race forward. Maybe they have to be crazy. How else can you stare at an empty canvas and see a work of art? Or gaze at a red planet and see a laboratory on wheels? While some may see them as the crazy ones, we see genius. Because people who are crazy enough to think they can change the world, are the ones who do.

John Appleseed

*À mes parents, ma sœur et mon neveu Charles, né durant ma thèse.
À mon ami Yoann, qui m'a prouvé que nos recherches sauvent des vies chaque jour.*

REMERCIEMENTS

Mes premières pensées de gratitude vont envers la Pr. Liliane Berti ainsi que le Dr. Frédéric Carrière et le Dr. Andrey Klymchenko pour me faire l'honneur d'accepter de rapporter ce travail de thèse. Je remercie également la Pr. Agnès Girard-Egrot qui a suivi l'évolution de mon travail durant ces années de thèse et qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Mes chaleureuses pensées de gratitude vont également envers mes deux encadrants de thèse, sans qui ce travail n'aurait indéniablement pu être réalisé. Je remercie tout d'abord le Pr. Abdelkarim Abousalham, directeur de ce travail de thèse, qui a toujours encouragé mes nouvelles idées et mes prises d'initiative. Son goût de la recherche et ses grandes connaissances nous ont amenés à de longues conversations scientifiquement enrichissantes, qui resteront gravées dans ma mémoire. Je tiens également à remercier le Dr. Alexandre Noiriel, co-encadrant de cette thèse, qui m'a toujours encouragé à me dépasser et qui m'a notamment enseigné la rigueur scientifique. Ses remarques constructives m'ont permis d'éviter le piège de croire ce que l'on voit et d'analyser mes résultats avec une vision impartiale.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire et notamment le Pr. René Buchet ainsi que les Dr. Olivier Marcillat et Thierry Granjon qui m'ont permis de développer mes connaissances en fluorescence et en biochimie des lipides. Je remercie également mes collègues de bureau et de paillasse, tout d'abord Meddy El Alaoui mais également Priscila Sutto Ortiz, Abdallah Khatib et Yani Arhab ainsi que les stagiaires et notamment Bich Chau Tran Nguyen et Ayse Erin pour leur bonne humeur chaque jour et leur aide très précieuse dans la réalisation de mon travail. Je souhaite, par ailleurs, exprimer mes profonds sentiments et remerciements à Houda Abla avec qui j'ai partagé des moments mémorables. Mes pensées vont également envers le Pr. David Magne, directeur de notre équipe, ainsi que les Dr. Laurence Bessueille, Carole Bougault, Anne Briolay, Leyre Brizuela-Madrid, Saïda Mebarek, et Alaeddine El Jamal, Monika Roszkowska, Najwa Skafi, Jihen Zouaoui, pour les agréables moments que nous avons passés durant toutes ces années.

Une pensée sincère va envers les membres de l'équipe GEMBAS, et notamment envers le Dr Bastien Doumèche, pour ses conseils avisés, ainsi que Julie Carter qui m'ont toujours accueilli avec le sourire. Un grand merci également à Michele Fiore et à Do LeDuy, pour leur très grande gentillesse et pour leur motivation ainsi que leur implication vis-à-vis de mes projets.

Enfin, je tiens à exprimer mes profonds remerciements envers ma famille, et notamment envers mes parents et ma sœur qui m'ont toujours soutenu et encouragé ainsi qu'à mes amis Yoann, Sylvie et Delphine.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX.....	24
AVANT-PROPOS.....	25
1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	27
1.1. Les membranes cellulaires.....	29
1.1.1. La compartimentalisation cellulaire.....	29
1.1.2. Structure des membranes cellulaires.....	30
1.1.3. Composition biochimique des membranes cellulaires.....	30
1.2. Les glycérophospholipides	34
1.2.1. Structures et localisations	34
1.2.2. Rôles et propriétés biochimiques.....	37
1.2.3. Organisation des phospholipides en milieu aqueux	44
1.3. Les phospholipases.....	48
1.3.1 Les phospholipases A.....	48
1.3.2. La phospholipase C	49
1.3.3. La phospholipase D	49
1.4. La superfamille des PLDs.....	51
1.4.1. Les PLDs à séquence consensus HKD.....	51
1.4.2. Les PLDs dépourvues de séquence consensus HKD	56
1.5. Les PLDs de plantes	60
1.5.1. Classification et rôles biologiques.....	60
1.5.2. Fonctions et localisations cellulaires.....	62
1.5.3. Purification et caractérisation de la PLD α	65
1.5.4. Expression recombinante des autres types de PLD d'Arabidopsis	68
1.6. Les domaines C2 des PLDs de plantes	69
1.6.1. Le domaine C2.....	69
1.6.2. Interactions avec le calcium et les membranes	72
1.6.3. Les domaines C2 chez les PLDs de plantes	73

1.7. Mécanismes de catalyse et d'inhibition des PLDs.....	75
1.7.1. La catalyse hétérogène.....	75
1.7.2. Cinétique interfaciale de la PLD.....	75
1.7.3. Mécanisme catalytique des PLDs à consensus « HKD ».....	77
1.7.4. Inhibition des PLDs	80
1.8. Méthodes de mesure des activités PLD.....	86
1.8.1. Dosage par radioactivité	86
1.8.2. Dosage à l'aide de phospholipides synthétiques.....	87
1.8.3. Dosage par réactions couplées	90
1.8.4. Autres méthodes de dosage du PA	94
1.8.5. Sondes fluorescentes potentiellement utilisables pour la mesure des activités PLD.....	95
2. Matériel et Méthodes	99
2.1. Matériel	101
2.1.1. Matériel de biologie moléculaire	101
2.1.2. Matériel de purification des protéines	107
2.1.3. Protéines et enzymes.....	108
2.1.4. Lipides et détergents.....	108
2.1.5. Appareillages	108
2.2. Méthodes	109
2.2.1. Modification du pGAPZB.....	109
2.2.2. Clonages des ADNc.....	110
2.2.3. Expression hétérologue des protéines recombinantes.....	113
2.2.4. Purification des protéines.....	117
2.2.5. Méthodes d'analyse des protéines	119
2.2.6. Renaturation et analyse des domaines C2	120
2.2.7. Mesure de l'activité enzymatique de la PLD.....	123
2.2.8. Dosage du PA par la 8HQ	125
3. Résultats et discussions	129
3.1. Expression, purification et caractérisation biochimique des PLDs et de leurs domaines fonctionnels.....	131
3.1.1. Clonage, expression chez E. coli et caractérisation des AtPLDα et -β ainsi que de leurs domaines fonctionnels	133
3.1.1.1. Clonages dans le vecteur pET28b.....	133
3.1.1.2. Expression et purification des domaines C2 α et C2 β	137
3.1.1.3. Renaturation des domaines C2 α et C2 β	140

3.1.1.4. Analyse de l'interaction des domaines C2 avec les phospholipides	143
3.1.1.5. Expression et caractérisation des AtPLD α et - β	144
3.1.2. Expression de l'AtPLDα chez <i>P. pastoris</i> et caractérisation	147
3.1.2.1. Clonage de l'AtPLD α dans le vecteur pGAPZB	147
3.1.2.2. Cinétique d'expression de l'AtPLD α chez <i>P. pastoris</i>	148
3.1.2.3. Purification de l'AtPLD α et séquençage N-terminal.....	149
3.1.3. Caractérisation des domaines C2 matures	153
3.1.3.1. Expression et purification des C2 α et C2 β matures.....	153
3.1.3.2. Renaturation des C2 α et - β matures.....	154
3.1.3.3. Analyse de l'interaction des domaines C2 matures avec les phospholipides	156
3.1.4. Prédiction des structures secondaires et modélisations 3D des domaines C2α et -β.....	159
3.1.5. Conclusion.....	164
3.2. Mise au point d'une méthode directe et continue de dosage de l'acide phosphatidique généré par la phospholipase D.....	165
3.2.1. Problématique	167
3.2.2. Détection du PA par la 8HQ	169
3.2.2.1 Interaction de la 8HQ avec le PA.....	169
3.2.2.2 Optimisation des conditions de détection du PA	171
3.2.2.3 Optimisation du dosage pour la mesure de l'activité PLD	173
3.2.2.4 Quantification du PA par la 8HQ.....	175
3.2.3. Application du test à la mesure de l'activité PLD.....	177
3.2.3.1. Purification de la VuPLD	177
3.2.3.2. Effet de la 8HQ sur l'activité de la VuPLD	178
3.2.3.3. Mesure de l'activité de la VuPLD	179
3.2.4. Spécificité du test vis-à-vis de l'activité PLD	181
3.2.5. Analyse de la préférence de substrat de la VuPLD.....	182
3.2.5.1. Spécificité de détection du PA	182
3.2.5.2. Préférence de substrat de la VuPLD	185
3.2.6. Suivi de la réaction de transphosphatidylaton.....	186
3.2.7. Application à l'inhibition de la VuPLD	189
3.2.8. Modifications chimiques de la 8HQ	193

3.2.9. Conclusion.....	199
Conclusion générale et perspectives.....	201
Références bibliographiques.....	207
Article 1	241
Article 2	257

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3D	Tridimensionnel
3HF	3-hydroxyflavone
8HQ	8-hydroxyquinoléine
ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
CaLB	<i>Calcium / lipid-binding domain</i>
CBR	<i>Calcium binding region</i>
CMC	Concentration micellaire critique
CL	Cardiolipine
CPC	Chlorure de cétypyridinium
CTAB	Bromure de cétyltriméthylammonium
Da	Dalton
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAG	Diacylglycérol
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
CPM	Désintégration par minute
dNTP	Désoxyribonucléoside tri-phosphate
DO	Densité optique
Domaine PX	Domaine d'homologie à phox
Domaine PH	Domaine d'homologie à la pleckstrine
EDTA	Acide éthylène-diamine tétraacétique
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
GAP	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GUV	<i>Giant unilamellar vesicles</i>
GV	Vésicules géantes
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPL	<i>Human pancreatic lipase</i> (lipase pancréatique humaine)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxydase du raifort)
IC	Conversion interne
IDA	Acide iminodiacétique
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
MCS	<i>Multiple cloning site</i> (site multiple de clonage)
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MLV	<i>Multi lamellar vesicles</i>
NaTDC	Taurodeoxycholate de sodium
NBD	7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole
PA	Acide phosphatidique
pb	Paire de bases
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDB	<i>Protein data bank</i>
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEtOH	Phosphatidyléthanol
PG	Phosphatidylglycérol

PI	Phosphatidylinositol
PPI	Phosphoinositides
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIPES	<i>Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
PLA ₁	Phospholipase A ₁
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PS	Phosphatidylsérine
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RBS	<i>Ribosome Binding Site</i> (site de fixation du ribosome)
rpm	Rotation par minute
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SM	Sphingomyéline
<i>sn</i>	<i>Stereospecific numbering</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i>
TAE	Tris, acétate, EDTA
TED	Tris(carboxyméthyl)éthylène diamine
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	Ultraviolet

Abréviations des PLDs

AhPLD	Phospholipase D d' <i>Arachis hypogaea</i>
AtPLD	Phospholipase D d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
BnPLD	Phospholipase D de <i>Brassica napus</i>
BoPLD	Phospholipase D de <i>Brassica oleracea</i>
CcPLD	Phospholipase D de <i>Cynara cardunculus</i>
GmPLD	Phospholipase D de <i>Glycine max</i>
hPLD	Phospholipase D humaine
HaPLD	Phospholipase D d' <i>Helianthus annuus</i>
OsPLD	Phospholipase D d' <i>Oryza sativa</i>
RcPLD	Phospholipase D de <i>Ricinus communis</i>
ScPLD	Phospholipase D de <i>Streptomyces chromofuscus</i>
VuPLD	Phospholipase D de <i>Vigna unguiculata</i>

LISTE DES FIGURES

Note : Sauf indication contraire, les figures présentées dans ce manuscrit sont des œuvres originales qui ont été créées dans le cadre de cette thèse.

Figure 1 :	Représentation schématique d'une cellule eucaryote animale ainsi que de ses organites cellulaires.	29
Figure 2 :	(A) Structure du double feuillet lipidique composant les membranes cellulaires. (B) Modèle de la mosaïque fluide des membranes.	30
Figure 3 :	Exemple de protéines intégrales, à un (a) ou plusieurs (b) domaines transmembranaires, de pores membranaires et de protéines périphériques.	31
Figure 4 :	Structures chimiques représentatives des glycérophospholipides (A), des sphingolipides (B) et des stérols (C), et de leurs constituants.	33
Figure 5 :	Représentation schématique de la structure des différents glycérophospholipides.	34
Figure 6 :	Distribution cellulaire des différents glycérophospholipides au sein des membranes de macrophages de souris.	35
Figure 7 :	(A) Asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique des érythrocytes humains. (B) Mécanismes de translocation des phospholipides membranaires.	36
Figure 8 :	Pourcentage d'ionisation et charge relative de la PC (A) et de la PE (B) en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).	37
Figure 9 :	Pourcentage d'ionisation et charge relative du PI en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).	38
Figure 10 :	Pourcentage d'ionisation et charge relative de la PS en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).	39
Figure 11 :	Pourcentage d'ionisation et charge relative du PG en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).	39
Figure 12 :	Représentation schématique de la structure du PA qui permet d'induire une courbure négative des membranes.	41
Figure 13 :	(A) Pourcentage d'ionisation et charge relative du PA en fonction du pH pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990). (B) Représentation schématique du modèle electrostatic-hydrogen bond switch entre le PA et la fonction amine primaire d'un résidu basique d'une protéine.	42
Figure 14 :	Exemples de cibles cellulaires activées par le PA, aboutissant aux phénomènes de stress oxydatif ainsi que de prolifération, de différenciation et de survie cellulaire.	44
Figure 15 :	Représentation schématique de l'organisation sous forme de films monomoléculaires des phospholipides à l'interface air-tampon.	45
Figure 16 :	Classification des différents types de liposomes en fonction de leurs tailles.	46

Figure 17 :	(A) Représentation schématique de l'organisation sous forme de micelles en milieu aqueux. (B) Formation de micelles en fonction de la concentration en détergents.	47
Figure 18 :	(A) Représentation schématique de la solubilisation de phospholipides sous forme de micelles mixtes par des détergents en milieu aqueux. (B) Structure du SDS et du Triton X-100.	47
Figure 19 :	Spécificité d'hydrolyse des phospholipases sur la PC.	48
Figure 20 :	Schéma des réactions d'hydrolyse ou de transphosphatidylaton, catalysées par la PLD sur la PC substrat, formant respectivement du PA ou un phosphatidyl-alcool.	49
Figure 21 :	Représentation schématique des domaines présents chez les PLDs de bactéries, plantes, levures, mammifères et l'endonucléase Nuc.	51
Figure 22 :	(A) Structure de la PLD de <i>Streptomyces</i> sp. PMF (PDB : 1F0I), d'après Leiros <i>et al.</i> (2000). (B) Structure et de l'endonucléase Nuc (PDB : 1BYR), d'après Stuckey <i>et al.</i> (1999). (C) Modèle 3D de la MitoPLD, d'après Choi <i>et al.</i> (2006), avec modifications.	54
Figure 23 :	(A) Structure du domaine PX de la NADH oxydase (p47phox) fixant le PIP ₂ (PDB : 1O7K). (B) Structure du domaine PH de la pleckstrine (PDB : 1PLS). (C) Structure du domaine C2A de la Synaptotagmin-1 (PDB : 1BYN) en présence des ions calcium (colorés en vert).	56
Figure 24 :	(A) Représentation schématique des interactions entre les résidus de la ScPLD avec ses ions métalliques cofacteurs (Fe ³⁺ , Mn ²⁺ et Ca ²⁺) et le groupe phosphatidyl du phospholipide substrat. (B) Structure 3D de la PLD de <i>Loxosceles reclusa</i> (PDB : 4RW3) sous forme d'intermédiaire réactionnel avec le <i>myo</i> -inositol 1-phosphate.	57
Figure 25 :	(A) Structure 3D de la NAPE-PLD humaine (PDB : 4QN9) en présence de son substrat, le NAPE, ainsi que des deux atomes de zinc (colorés en verts). (B) Structure 3D de l'ATX murine (PDB : 5LOB), utilisée pour la conception in silico d'inhibiteurs.	58
Figure 26 :	Classification, localisation chromosomique et architecture des PLDs d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	60
Figure 27 :	Interaction de la PLD α avec le complexe ESCRT de type III, permettant de transporter certaines protéines vers différents compartiments cellulaires, tel que le milieu extracellulaire ou bien la vacuole.	63
Figure 28 :	Modèles de basse résolution de la structure 3D de la BoPLD α 2 obtenus à partir des données de diffusion de rayons X aux petits angles.	68
Figure 29 :	Structures 3D des domaines C2 de la cPLA2 (cPLA ₂ -C2), de la PKC α (PKC α -C2) et de la synaptotagmine (C2A) interagissant avec la membrane en présence de Ca ²⁺ .	69
Figure 30 :	Modèles de repliements des domaines C2 de la cPLA ₂ , de la PLC δ 1 et de la SytIA et représentations schématiques de leurs régions de liaison au calcium.	70
Figure 31 :	Représentation schématique des topologies présentées par les domaines C2. Les topologies sont basées sur les structures des domaines C2 de la SytIA (topologie I), de la PI-PLC- δ 1 (topologie II) et de la HPL (topologie III).	71

Figure 32 :	Structure cristallographique du domaine C2 de la PKC α montrant les sites de fixation aux phospholipides de manière Ca ²⁺ -dépendante et Ca ²⁺ -indépendante.	72
Figure 33 :	Alignement des séquences en acides aminés des domaines C2 α (AtC2 PLD α) et - β (AtC2 PLD β) d' <i>Arabidopsis thaliana</i> avec les domaines C2 de la cPLA ₂ (code PDB : 1RLW) et des PKC ϵ et - η (codes PDB : 1GMI et 2FK9, respectivement).	74
Figure 34 :	Modèle de catalyse hétérogène des phospholipases d'après Verger <i>et al.</i> (1973).	75
Figure 35 :	Interaction membranaire des PLD, selon le mode « Hopping » (A) et « scooting » (B).	76
Figure 36 :	(A) Mécanisme réactionnel de type ping-pong des PLDs à consensus HKD. (B) Structure 3D de la PLD de <i>Streptomyces</i> sp. souche PMF, présentant l'intermédiaire covalent phosphatidyl-PLD formé lors de l'hydrolyse de la dibutyril-PC (PDB : 1V0Y).	77
Figure 37 :	Mécanisme réactionnel catalysé par la PLD.	79
Figure 38 :	Structure chimique des composés décrits comme des inhibiteurs indirects, in cellulo, de l'activité PLD.	81
Figure 39 :	Composés mimant le groupement phosphate des phospholipides et capables d'inhiber de manière compétitive les PLDs, in vitro.	83
Figure 40 :	Composés issus de sources naturelles inhibant de manière directe les PLDs d'origines eucaryotes ou procaryotes.	84
Figure 41 :	Structures chimiques de l'halopémide et de ses dérivés. Les composés VU0359595 et VU0285655 sont des inhibiteurs spécifiques de la hPLD1 et de la hPLD2, respectivement.	85
Figure 42 :	Principe du dosage des activités PLD par radioactivité.	87
Figure 43 :	Structure du NBD-PC, qui présente un groupement NBD fluorescent sur la chaîne acyle en position sn-2.	88
Figure 44 :	Représentation schématique du test basé sur l'utilisation de substrats synthétiques composés de groupements fluorophore (F) et atténuateur de fluorescence (A).	88
Figure 45 :	(A) Représentation schématique du test utilisant le graphène comme atténuateur de fluorescence pour la mesure des activités PLD. (B) Représentation schématique du test à conversion ascendante.	89
Figure 46 :	Représentation schématique du test enzymatique de la PLD basé sur l'utilisation du phosphatidyl- <i>p</i> -nitrophenol.	90
Figure 47 :	Représentation schématique du test PLD basé sur le dosage de la choline libérée lors de la réaction d'hydrolyse, en utilisant les réactions couplées choline oxydase / peroxydase, par absorbance ou par fluorescence.	91
Figure 48 :	Représentation schématique du test de mesure des activités PLD à l'interface de monocouches de Langmuir.	92
Figure 49 :	Représentation schématique du test PLD basé sur le dosage du phosphate inorganique, suite à sa libération par la phosphatase alcaline, formant du bleu de molybdène, en présence de molybdate d'ammonium et d'acide ascorbique.	93

Figure 50 :	Représentation schématique du test PLD basé sur la compétition pour le Fe^{3+} entre l'acide salicylique et le PA, suite à la réaction d'hydrolyse.	94
Figure 51 :	Diagramme de Perrin–Jablonski illustrant le passage de l'état fondamental (S_0) d'un fluorophore vers les états excités (S_1 ou S_2), suite à l'absorption d'un photon et conduisant au phénomène de fluorescence.	96
Figure 52 :	(A) Représentation schématique du peptide synthétique développé par Shults et collègues, qui permet de détecter le groupement phosphate par un dérivé de la 8HQ, en présence de Mg^{2+} , et suite à la phosphorylation par une kinase. (B) Représentation du phénomène de tautomérisation photo-induite (1) subit par la 8HQ, en l'absence de métal, et du phénomène d'amplification de fluorescence par chélation (2), en présence d'ions métalliques (Me^{2+}).	98
Figure 53 :	Représentation schématique du vecteur pET28b et séquence de sa région d'expression, contenant le site multiple de clonage (MCS).	102
Figure 54 :	Représentation schématique du vecteur pGAPZB, utilisé pour l'expression dans <i>P. pastoris</i> , ainsi que de sa cassette de clonage.	103
Figure 55 :	Étapes de la stratégie utilisée pour modifier le MCS du pGAPZB.	109
Figure 56 :	Représentation schématique de la transformation de <i>P. pastoris</i> avec le pGAPZB par recombinaison homologue.	116
Figure 57 :	Position des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant les PLD et leurs différents domaines.	133
Figure 58 :	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des amplifications par PCR avec la KOD polymérase sur les ADNc des PLD.	135
Figure 59 :	(A) Criblage par PCR avec la Taq polymérase des clones recombinants pour le domaine C2 de la PLD α sur gel d'agarose 1,5 %. (B) Criblage par PCR avec la Taq polymérase des clones recombinants pour l'AtPLD β ou son domaine C2 sur gel d'agarose 1,5 %.	135
Figure 60 :	(A) Vérifications par restriction des constructions purifiées. (B) Criblage par PCR des clones recombinants du pET28b-AtPLD β digéré avec NcoI puis reliqué sur lui-même.	136
Figure 61 :	Analyse par SDS-PAGE 15 % de l'expression à 37°C des domaines C2 α et C2 β .	137
Figure 62 :	Analyse par SDS-PAGE (A) et immunoempreinte (B) de la présence éventuelle du domaine C2 β dans la fraction microsomale.	138
Figure 63 :	Criblage de la concentration minimale d'urée nécessaire à la solubilisation des domaines C2 α et C2 β . A : Solubilisation du domaine C2 α . B : Solubilisation du domaine C2 β .	139
Figure 64 :	Analyse par SDS-PAGE 15 % des domaines C2 α et β purifiés par chromatographie d'affinité.	139
Figure 65 :	Spectres d'émission de fluorescence des domaines C2 α (A) et C2 β (B), en présence de 8 M d'urée (spectre bleu), renaturés par dilution rapide (spectre rouge) et après ajout de 1 mM d'ions calcium (spectre vert) après excitation à 280 nm.	141
Figure 66 :	Spectres de dichroïsme circulaire des domaines C2 α (A) et C2 β (B) renaturés par dilution rapide en présence de 50 mM d'urée.	142

Figure 67 :	Analyse par "dot-blot" de l'interaction des domaines C2 α et C2 β avec des lipides immobilisés sur une membrane de PVDF en l'absence (A) et en présence de 1 mM de Ca ²⁺ (B).	143
Figure 68 :	(A) Analyses par SDS-PAGE 12 % de l'expression à 37°C des PLD α et β . (B) Analyse par SDS-PAGE 10 % de l'induction de l'expression à 20°C des PLD α et β .	144
Figure 69 :	(A) Analyse par SDS-PAGE 10 % de l'induction de l'expression à 20°C de la PLD α d'Arabidopsis sans étiquette 6xHis. (B) CCM de l'analyse de l'activité de la PLD α exprimée sans étiquette 6xHis.	145
Figure 70 :	Analyse sur gel d'agarose (1,5 %) du criblage par PCR avec la Taq polymérase des clones recombinants transformés par le vecteur vide (A), l'AtPLD α -WT (B), ou l'AtPLD α -6xHis (C).	148
Figure 71 :	(A) Activité PLD dans des extraits protéiques bruts de <i>Pichia pastoris</i> transformée par le vecteur vide ou exprimant l'AtPLD α -WT recombinante ou bien l'AtPLD α -6xHis, après 4 jours de culture.	148
Figure 72 :	(A) Chromatogramme de la purification sur colonne d'Octyl-Sépharose de l'AtPLD α -WT exprimée chez <i>P. pastoris</i> . (B) Analyse par SDS-PAGE (10 %) des fractions d'élution réunies et concentrées.	149
Figure 73 :	Alignement des séquences protéiques des régions N-terminales de différentes PLD α purifiées.	150
Figure 74 :	(A) Analyse par SDS-PAGE 15 % de l'expression à 37°C domaines mC2 α et mC2 β . (B) Analyse par SDS-PAGE 15 % des domaines mC2 α et mC2 β purifiés par chromatographie d'affinité.	153
Figure 75 :	Spectres de fluorescence intrinsèque (λ_{ex} 280 nm) des domaines mC2 α (A) et mC2 β (B) dilués dans un tampon Tris / HCl contenant 8 M d'urée (courbes rouges) ou en sans urée (courbes bleues) et après 1 h d'incubation, à température ambiante.	154
Figure 76 :	(A) Analyse par "dot-blot" de l'interaction des domaines mC2 α (panneau de gauche) ou mC2 β (panneau du milieu) avec des lipides immobilisés sur une membrane de PVDF en présence de 1 mM de Ca ²⁺ ou de 1 mM d'EDTA, en comparaison avec le contrôle négatif (panneau de droite). (B) Analyse de la fixation relative des domaines mC2 α (panneau de gauche) et mC2 β (panneau de droite) aux vésicules phospholipidiques, par FRET.	157
Figure 77 :	Prédiction des structures secondaires des mC2 α et mC2 β , dont les séquences protéiques sont alignées contre les séquences de domaines C2 de structures connues.	159
Figure 78 :	Diagrammes de Ramachandran pour les modèles structuraux des domaines C2 α (A) et C2 β (B).	161
Figure 79 :	Modèles proposés pour la structure des domaines C2 α (A) et C2 β (B), en utilisant le serveur I-tasser et fixé à la membrane en utilisant le serveur PPM.	162
Figure 80 :	Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en présence ou en l'absence de 0,26 mM de POPA, à pH 8 et en présence de 1 mM de plusieurs variétés de détergent et de 20 mM de CaCl ₂ .	170
Figure 81 :	Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en présence de 0,26 mM de POPA ou de 0,26 mM de POPC.	171

Figure 82 :	(A) Spectres d'émission de fluorescence de la 8HQ (λ_{exc} 366 nm) à pH 8 en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS et de 0,26 mM de POPA en présence (courbe rouge) ou en l'absence (courbe verte) de 20 mM de Ca^{2+} ainsi que de 0,26 mM de POPC en présence (courbe bleue) ou en l'absence (courbe violette) de 20 mM de Ca^{2+} . (B) et (C) Fluorescence des solutions de POPC (B) et de POPA (C) en présence de 20 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Triton X-100 et 0,7 mM de SDS, éclairées sous UV (360 nm).	174
Figure 83 :	Analyse des micelles mixtes par DLS. Profile de la distribution des micelles mixtes composées de 0,26 mM de POPC (A) ou de POPA (B) et en présence de 20 mM de Ca^{2+} 1 mM de Triton X-100 et 0,7 mM de SDS, à pH 8.	175
Figure 84 :	Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{exc} 366 nm) à pH 8 en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca^{2+} et de proportions variables de POPC/POPA (0,26 mM final) en fonction du temps, suite à l'injection de Ca^{2+} (A) et en fonction de la concentration de POPA (B).	175
Figure 85 :	(A) Chromatogramme de la purification sur colonne d'Octyl-Sépharose de la VuPLD exprimée chez <i>P. pastoris</i> . (B) Analyse par SDS-PAGE 10 % et révélation au bleu de Coomassie des fractions d'éluion 87 à 98, contenant l'activité PLD.	177
Figure 86 :	Activité spécifique de la VuPLD, en présence de concentrations croissantes de 8HQ. Les activités ont été mesurées en dosant la choline par le test chromogénique choline oxydase / peroxydase.	178
Figure 87 :	Principe du test PLD basé sur l'utilisation de la 8HQ.	179
Figure 88 :	(A) Suivi de l'intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{exc} 366 nm) en fonction du temps, suite à l'injection de 1 pmol de VuPLD (courbe rouge) ou de VuPLD inactivée par la chaleur (courbe bleue). (B) Vitesse de formation de POPA suite à l'hydrolyse de la POPC en fonction de la quantité de VuPLD.	180
Figure 89 :	Mesure des activités PLD de (A) différentes phospholipases ou (B) de lysats cellulaires de <i>Pichia pastoris</i> exprimant la VuPLD recombinante ou transformée par son vecteur vide.	181
Figure 90 :	Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{exc} 366 nm) en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca^{2+} et en présence de 0,26 mM de POPC, POPE, POPG, POPS ou de POPA, à pH 8.	183
Figure 91 :	Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{exc} 366 nm) en fonction de concentrations croissantes de POPA en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca^{2+} et 0,26 mM de phospholipides, à pH 8. (A) Micelles mixtes de POPA, (B) mélange de POPA/POPE, (C) de POPA/POPG ou (D) de POPA/POPS.	184
Figure 92 :	(A) Mesure de l'activité spécifique de la VuPLD en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca^{2+} et de 0,26 mM de POPC, POPE, POPG ou de POPS, à pH 8. (B) Analyse par CCM (révélation au diode) des produits de réaction obtenus en (A) au temps 0 min (a) et 30 min (b).	185
Figure 93 :	(A) Inhibition de la formation de PA en présence d'alcools primaires et secondaires, en utilisant la POPC comme substrat et 1 pmol de VuPLD.	187

(B) et (C) Analyse par CCM des produits de réaction obtenus en (A) après 30 min de réaction (B) ou immédiatement après l'injection de VuPLD (C).

- Figure 94 :** (A) Cinétique de la formation de PA par la VuPLD en utilisant la POPC comme substrat dans les conditions optimisées précédemment et en l'absence (courbe bleue) ou en présence de d'éthanol à des concentrations de 0.1 M (courbe rouge), de 0.5 M (courbe verte), de 1 M (courbe violette), de 2 M (courbe bleu clair) et de 3 M (courbe orange). (B) Vitesse de la formation de PA, obtenu en (A), en fonction de la concentration en éthanol. **188**
- Figure 95 :** Contrôle de l'activité de la VuPLD en présence de quantités croissantes de DMSO, sans incubation (bleu clair) ou après une pré-incubation de 30 min à température ambiante (bleu foncé). Les activités sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle sans DMSO et sans pré-incubation. **190**
- Figure 96 :** Tests d'inhibition de la VuPLD (0.6 nM). (A) Contrôle de l'inhibition de la formation de PA par la VuPLD, en l'absence (-) ou en présence de 750 mM d'éthanol (+). (B) Test d'inhibition de la VuPLD en présence de quantités croissantes de ciclosporine A (bleu clair) ou de resvératrol (bleu foncé). (C) Test d'inhibition de la VuPLD en présence de 40 μ M d'halopéride ou de ses dérivés. **191**
- Figure 97 :** (A) Cinétique de la formation de PA par la VuPLD en utilisant la POPC comme substrat et en présence de concentrations croissantes de vanadate de sodium. (B) Vitesse de la formation de PA en fonction de la concentration en vanadate de sodium. (C) Analyse par CCM et révélation au diode des produits de réaction obtenus. **192**
- Figure 98 :** (A) Structure de la 8HQ5S. (B) Spectres d'émission de fluorescence de la 8HQ (traits discontinus) et de la 8HQ5S (traits pleins) en présence de 20 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS et 0,26 mM de POPA (en rouge) ou 0,26 mM de POPC (en bleu), à pH 8 (λ_{ex} 366 nm) (C) Intensité de fluorescence de la 8HQ5S à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en fonction de la concentration de Ca^{2+} et en présence de 1 mM de Triton X-100 et de 0,26 mM de POPA ou de 0,26 mM de POPC, à pH 8. **193**
- Figure 99 :** Schéma réactionnel de la synthèse des dérivés de la 8HQ. **194**
- Figure 100 :** Spectres d'émission de fluorescence de (A) la 8HQ5,7S(bis)12N (traits pleins) et de (B) la 8HQ5S12N (traits pleins) en comparaison avec la 8HQ (tirets) et en présence de 20 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS et 0,26 mM de POPA (en rouge) ou 0,26 mM de POPC (en bleu), à pH 8 (λ_{ex} 366 nm). **195**
- Figure 101 :** Suivi de l'intensité de fluorescence à 460 nm (λ_{ex} 366 nm) de la 8HQ (en bleu) et de la 8HQ5S12N (en rouge) en fonction du temps, suite à l'injection de 1 pmol de VuPLD, en présence de 0,26 mM de POPC, 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS et 20 mM de Ca^{2+} , à pH 8. **197**
- Figure 102 :** Visualisation par microscopie confocale de GVs, composées de POPC (A) ou d'un mélange de POPC / POPA pour un rapport 80 / 20 (B), en utilisant les filtres DAPI (435-485 nm) ou GFP (500-550 nm), en présence de 0,2 mM de 8HQ5S12N et de 20 mM de Ca^{2+} , dans un tampon Tris/Bicine à pH 8. **197**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Principaux composants de la membrane plasmique de divers organismes.	32
Tableau 2 :	Composition lipidique de cellules animales et de leurs organites.	33
Tableau 3 :	Tableau récapitulatif des protéines démontrées comme interagissant avec le PA.	44
Tableau 4 :	Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant pour les PLDs et leurs différents domaines.	106
Tableau 5 :	Couples d'amorces utilisés pour le criblage des clones recombinants par PCR avec la Taq polymérase.	106
Tableau 6 :	Enzymes utilisées pour les vérifications par restriction et tailles attendues des fragments résultants.	107
Tableau 7 :	Paramètres théoriques des protéines exprimées. aa : nombre d'acides aminés.	138
Tableau 8 :	Paramètres théoriques des PLD α et - β exprimées. aa : acides aminés.	145
Tableau 9 :	Structures empreintes sélectionnées par les serveurs Geno3D, Phyre et I-Tasser pour modéliser par analogie la structure des domaines C2 α et β .	161

AVANT-PROPOS

Longtemps considérées comme de simples barrières inertes, les membranes cellulaires se sont révélées être, au fil des années, l'un des éléments les plus fondamentaux de la cellule. C'est notamment dans les phénomènes de signalisation cellulaire que les membranes se sont révélées être d'une importance capitale. En effet, la production de lipides bioactifs a longtemps été considérée comme marginale, au profit de l'étude des voies de signalisation cytosolique. Néanmoins, bien qu'il soit évident que ces dernières soient des actrices majeures de la physiologie cellulaire, le rôle des voies de signalisation membranaire apparaît, de nos jours, tout aussi central.

En effet, les membranes cellulaires apparaissent comme un haut lieu d'échange et de transduction des signaux cellulaires, dont le caractère dynamique est majoritairement contrôlé par l'action des phospholipases, qui assurent le renouvellement métabolique des glycérophospholipides, constituants majeurs de ces membranes. Ainsi, le rôle fondamental des médiateurs lipidiques peut, notamment, être illustré par la production de l'acide phosphatidique (PA) *via* l'action de la phospholipase D (PLD). En effet, la PLD est une enzyme capable d'hydrolyser la liaison phosphodiester distale des glycérophospholipides membranaires, afin de libérer leurs têtes polaires et de générer du PA. Initialement découverte chez les plantes, la PLD est classiquement composée d'un motif catalytique dupliqué, de séquence consensus **HXKX₄D** (où x représente un acide aminé quelconque), qui adopte une conformation dite en « selle de cheval », afin de former un motif catalytique complet. Les travaux de recherche de ces dernières décennies ont conduit à l'identification d'homologues dans un large éventail d'organismes d'origines procaryotes, telles que les bactéries et les Archaea, mais aussi eucaryotes, tels que les animaux, les plantes et les levures.

Le PA généré par la PLD est un médiateur lipidique essentiel, puisque impliqué dans les phénomènes de trafic vésiculaire, en induisant une courbure négative des membranes, mais également dans les phénomènes de signalisation cellulaire, *via* l'activation de nombreuses voies de signalisation cytosoliques et membranaires. Par conséquent, *via* la production de PA, la PLD apparaît comme un acteur clé de la signalisation cellulaire et son implication dans diverses pathologies humaines, telles que certaines maladies neurodégénératives ainsi que certains cancers, n'est aujourd'hui plus à démontrer. La caractérisation, *in vitro*, de la PLD se révèle donc essentielle à la compréhension des phénomènes qui régissent le développement de ces pathologies et son inhibition représente un enjeu majeur en santé humaine.

Cependant, la mise en place de tels travaux s'avère d'une grande complexité, puisqu'à ce jour, la majorité des tests PLD disponibles sont soit discontinus ou bien basés sur la détermination enzymatique (indirecte) de la tête polaire, suite à la réaction d'hydrolyse. Ceci complique ainsi le criblage d'inhibiteurs spécifiques, puisque l'utilisation de ces tests implique la mise en place de contrôles, à chaque étape de la réaction, ainsi qu'une multiplication du nombre de prise d'essais. Par ailleurs, l'étude des PLDs de mammifères

s'avère laborieuse, puisque très difficilement exprimables de manière fonctionnelle, en système hétérologue. *A contrario*, les PLDs de plantes, qui partagent le même site catalytique, apparaissent beaucoup plus simples à caractériser, celles-ci pouvant être exprimées de manière fonctionnelle en système hétérologue ou purifiées directement à partir du matériel végétal.

Chez *Arabidopsis thaliana*, modèle d'étude en génétique végétale, 12 isoformes ont été décrites, à ce jour. Celles-ci diffèrent, d'une part, par leur spécificité de substrat et, d'autre part, par leur mode de régulation, tel que leur dépendance vis-à-vis du Ca^{2+} . En effet, la région N-terminale des PLDs de plantes est homologue au domaine C2, impliqué dans leur interaction de manière Ca^{2+} -dépendante avec la membrane. Ainsi, la différence la plus notable concerne très certainement l'isoforme α (AtPLD α), qui requiert une concentration de 20 mM de Ca^{2+} pour être totalement active, *in vitro*, tandis que les autres isoformes, telles que la PLD β (AtPLD β), ne nécessitent que 100 μM de Ca^{2+} , *in vitro*. Il apparaît, par conséquent, possible que leurs domaines C2 respectifs présentent des affinités différentes pour le Ca^{2+} , à l'origine des différences de régulation observées.

C'est pourquoi, nous avons construit cette thèse autour de deux grands axes. Le premier axe a pour objectif l'expression de manière recombinante, la purification et la caractérisation biochimique des AtPLD α et $-\beta$, ainsi que de leurs domaines C2 respectifs, afin de comparer leur interaction avec la membrane, en présence de Ca^{2+} . Le second axe, quant à lui, a pour but de développer une nouvelle méthode de dosage du PA généré par la PLD, en continu et à l'échelle d'une microplaque, afin de pallier les défauts des tests précédemment développés.

Pour cela, la première partie de ce manuscrit sera consacrée à la revue bibliographique des propriétés physico-chimiques des phospholipides ainsi que des caractéristiques structurales et fonctionnelles des membres de la superfamille des PLDs, incluant leurs mécanismes de catalyse et d'inhibition. Cette revue bibliographique inclura, par ailleurs, une description beaucoup plus détaillée des PLDs de plantes ainsi que de leur domaine C2. Enfin, un dernier chapitre sera consacré à la description des méthodes de dosage des activités PLD, disponibles à ce jour, ainsi que des sondes fluorescentes potentiellement utilisables pour pallier leurs faiblesses. La seconde partie de ce manuscrit sera, quant à elle, consacrée à la description du matériel et des méthodes employés pour mener à bien les expériences effectuées.

Enfin, la troisième et dernière partie de ce manuscrit présentera les résultats que j'ai obtenus au cours de mon travail de thèse. Ainsi, le premier axe présentera les résultats d'expression, en système bactérien et en système levure, de purification et de caractérisation biochimique des PLD α et $-\beta$ d'*Arabidopsis thaliana* ainsi que de leurs domaines C2 respectifs. Le second axe présentera, quant à lui, le développement d'une nouvelle méthode de dosage du PA généré par la PLD, de manière continue et à l'échelle d'une microplaque. Enfin, l'utilisation de ce test, basé sur la propriété d'amplification de fluorescence par chélation de la 8-hydroxyquinoléine (8HQ) en présence de Ca^{2+} , sera développée et ses améliorations seront présentées.

1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les membranes cellulaires

1.1.1. La compartimentalisation cellulaire

Les cellules représentent la plus petite unité du vivant, capables de se diviser et d'évoluer de manière autonome. L'une des propriétés la plus remarquable des cellules est sans conteste la présence de membranes, telles que la membrane plasmique, qui leur permet de réguler les échanges bidirectionnels de molécules et d'ions entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. En effet, les membranes sont présentes dans tous les organismes vivants qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, et permettent une compartimentalisation moléculaire, qui est sans nul doute à l'origine de la vie. Par ailleurs, longtemps considérées comme de simples barrières inertes, ces membranes, composées de lipides amphiphiles et de protéines, se sont rapidement révélées être l'un des éléments le plus fondamental de la cellule. Outre leurs rôles dans la compartimentalisation, ces membranes interviennent également dans les phénomènes de signalisation et d'homéostasie cellulaire, permettant ainsi aux cellules de contrôler leurs compositions en ions et en nutriments. Ainsi, chez les organismes eucaryotes, ces membranes ont notamment permis la formation d'organites cellulaires qui sont des régions spécialisées dans la synthèse et le maintien des molécules indispensables à la cellule (Figure 1).

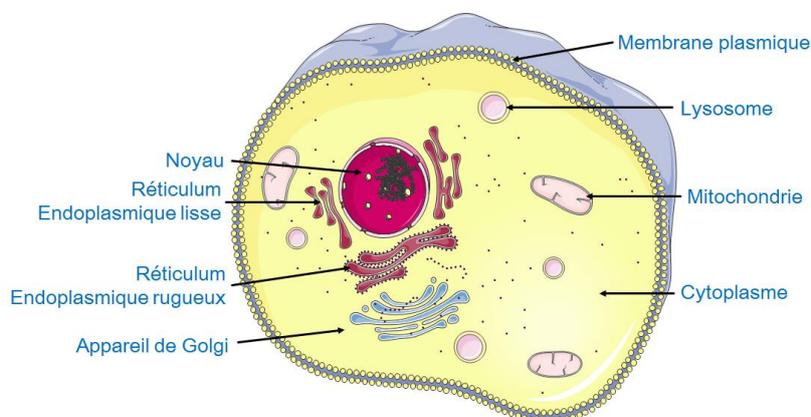


Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule eucaryote animale ainsi que de ses organites cellulaires.

En effet, chaque organite possède un rôle spécifique au sein de la cellule, tel que le maintien de l'information génétique dans le noyau, la synthèse et la maturation de protéines dans le compartiment cytoplasmique, le réticulum endoplasmique (RE) rugueux et l'appareil de Golgi ou encore, la synthèse de lipides dans le RE lisse (Nelson *et al.*, 2004). Par ailleurs, il est à noter que certains organites, tels que les mitochondries et les chloroplastes, sont le fruit d'une endo-symbiose avec des bactéries ancestrales. En effet, ces organites possèdent leur propre génome et jouent des rôles importants dans le métabolisme énergétique de la cellule, *via* les réactions de phosphorylations oxydatives ou encore de photosynthèse.

1.1.2. Structure des membranes cellulaires

Depuis la première observation d'une cellule au microscope en 1665 par Hooke (Hooke, 1665), l'investigation de la nature des cellules et des membranes n'a cessé d'évoluer. C'est en 1925 que Gorter et Grendel (Gorter *et al.*, 1925) ont émis pour la première fois l'hypothèse de l'existence d'une membrane composée d'un double feuillet de lipides amphiphiles. Comme le montre la figure 2A, cette structure particulière présente deux parties externes hydrophiles, en contact avec les molécules d'eau, qui sont séparées par une partie interne hydrophobe, afin de former une barrière imperméable à l'eau et aux molécules hydrophiles.

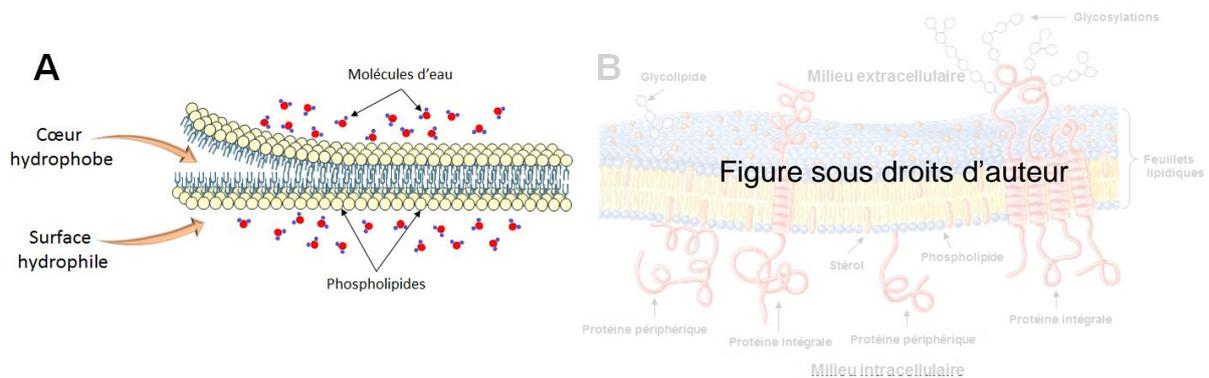


Figure 2 : (A) Structure du double feuillet de lipidique composant les membranes cellulaires. (B) Modèle de la mosaïque fluide des membranes (d'après Nelson *et al.* (2004), avec modifications).

L'hypothèse de cette structure n'a cessé de prendre de l'ampleur, grâce à l'évolution des techniques de biochimie, jusqu'en 1972 où Singer et Nicolson (Singer *et al.*, 1972) ont introduit le modèle de la mosaïque fluide des membranes (Figure 2B). Ce modèle, qui est toujours d'actualité (Nicolson, 2014), représente la membrane cellulaire comme une structure composée d'un double feuillet lipidique et de protéines transmembranaires ou associées à la membrane. Cette membrane apparaît extrêmement dynamique, d'une part, en contrôlant les échanges d'ions ainsi que de nutriments, et d'autre part en étant également un lieu de métabolisme et de signalisation cellulaire.

1.1.3. Composition biochimique des membranes cellulaires

Bien que les compositions biochimiques des membranes diffèrent selon les organismes et varient entre les divers organites cellulaires eux-mêmes, celles-ci présentent, néanmoins, plusieurs points communs. En effet, ces membranes sont majoritairement composées de protéines ainsi que de lipides, tels que les phospholipides et les stérols. Ces éléments sont retrouvés en proportions variables et sont propres à chaque type cellulaire, tel que résumé dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principaux composants de la membrane plasmique de divers organismes. Adapté de Nelson *et al.* (2004).

	Composant (% massique)			
	Protéines	Phospholipides	Stérols	Autres
Gaine de myéline	30	30	19	21
Hépatocyte de souris	45	27	25	3
Feuilles de maïs	47	27	7	19
Levure	52	7	4	37
<i>E. coli</i>	75	25	0	0

1.1.3.1 Les protéines membranaires

On distingue deux types de protéines membranaires, les protéines transmembranaires, ou intrinsèques, et les protéines périphériques, ou associées aux membranes (Figure 3). Celles-ci diffèrent par leur capacité à s'insérer dans les membranes et présentent des rôles et des modes de synthèse différents. En effet, les protéines transmembranaires peuvent présenter un ou plusieurs domaines qui traversent entièrement la membrane, exposant ainsi une ou plusieurs parties de la protéine de chaque côté de la membrane (Figure 3).

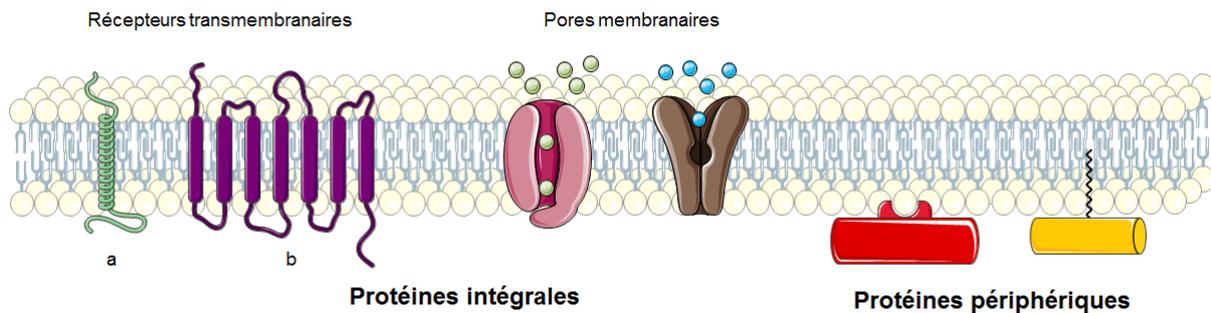


Figure 3 : Exemples de protéines intégrales, à un (a) ou plusieurs (b) domaines transmembranaires, de pores membranaires et de protéines périphériques.

Ces protéines transmembranaires sont synthétisées *via* la voie du RE rugueux, qui leur permet de s'insérer dans la membrane durant le processus de traduction. Elles ont souvent des rôles de récepteurs cellulaires, tels que les récepteurs couplés aux protéines G, ou encore de canaux, tels que les canaux ioniques (Figure 3). Ces protéines permettent ainsi la transduction des signaux cellulaires des voies endocrines, exocrines et autocrines mais aussi le contrôle de l'absorption des ions et des nutriments hydrosolubles.

A contrario, les protéines périphériques sont synthétisées en suivant la voie classique dans le cytosol. Elles se localisent ensuite sur le feuillet cytosolique des membranes *via* des domaines d'interaction aux lipides ou bien grâce à l'addition post-traductionnelle d'acides gras ou d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) lors du processus de maturation (Figure 3). Ces protéines ont souvent des rôles dans le

métabolisme lipidique, telles que certaines carboxylesterhydrolases, ainsi que dans la transduction du signal, telles que les protéines G.

1.1.3.2. Les lipides membranaires

Les lipides composant les membranes cellulaires sont majoritairement représentés par les trois catégories que sont les phospholipides, les sphingolipides et les stérols (Fahy *et al.*, 2009), tels que décrit dans la figure 4. Il s'agit de lipides complexes dont les proportions varient d'un type cellulaire à l'autre mais aussi d'un organe à l'autre, tel que présenté dans le tableau 2.

Tableau 2 : Composition lipidique de cellules animales et de leurs organites. (a) Cellules de rat (exprimé en % de la masse totale), d'après Christie (1985), (b) Macrophages de souris RAW264.7 (exprimé en % des lipides totaux), d'après Andreyev *et al.* (2010).

	Glycérophospholipides	Sphingolipides	Stérols	Autres
Hépatocytes (a)	84	2	7	7
Érythrocytes (a)	59	8	30	3
	Noyau	2	20	18
Macrophages (b)	Mitochondrie	0,3	2,9	14,4
	RE	71,4	5,7	1,5
	Membrane Plasmique	54,9	6,7	36,6

- Les glycérophospholipides :

Les glycérophospholipides (Figure 4A), dont le principal représentant est la phosphatidylcholine (PC), sont des lipides complexes amphiphiles. En effet, ces lipides présentent une partie hydrophobe qui est composée de deux chaînes acyles. La longueur et l'insaturation de ces chaînes acyles jouent un rôle essentiel dans l'organisation des lipides ainsi que dans la fluidité des membranes. Ces chaînes acyles sont estérifiées sur les positions *sn-1* et *sn-2* (*stereospecific numbering*) d'une molécule de glycérol, formant ainsi du diacylglycérol (DAG) (Figure 4A), tandis qu'un groupement phosphate est estérifié sur la position *sn-3* formant ainsi l'acide phosphatidique (PA). Dans la majorité des cas, un groupement polaire, tel que la choline, est lié au PA *via* son groupement alcool primaire par une liaison phosphodiester, formant *in fine* le phospholipide (Figure 4A).

- Les sphingolipides :

Les sphingolipides sont, de manière similaire aux glycérophospholipides, des lipides complexes composés d'une molécule de sphingosine, qui est un alcool aminé à longue chaîne insaturée. Le groupement amine de la sphingosine est lié à une chaîne acyle *via* une liaison amide (Figure 4B). Cette molécule, qui forme un céramide (Figure 4B), peut-être elle aussi estérifiée par un groupement phosphate afin de générer une molécule de céramide-1-phosphate. Enfin, l'ajout d'une tête polaire, telle que la choline, sur le groupement phosphate

permet, à l'instar de la PC, de former une molécule de sphingomyéline (SM) (Figure 4B), qui est l'un des sphingolipides les plus répandus. D'autres sphingolipides, estérifiés avec un groupement phosphoryléthanolamine sont également possibles.

- **Les stérols :**

Enfin, les membranes cellulaires possèdent des stérols qui permettent notamment de réguler la fluidité et la perméabilité des bicouches phospholipidiques (Nelson *et al.*, 2004). Ces lipides dérivent d'un noyau stérane, composé de trois cycles à 6 atomes de carbone et d'un cycle à 5 atomes de carbone (Figure 4C). Ces stérols sont présents dans tous les organismes eucaryotes et sont principalement représentés par le cholestérol chez les mammifères et l'ergostérol chez les levures (Figure 4C). *A contrario*, les plantes présentent une très grande diversité de stérols, tels que le sitostérol qui est le principal représentant chez *A. thaliana* (Figure 4C) (Schaeffer *et al.*, 2002).

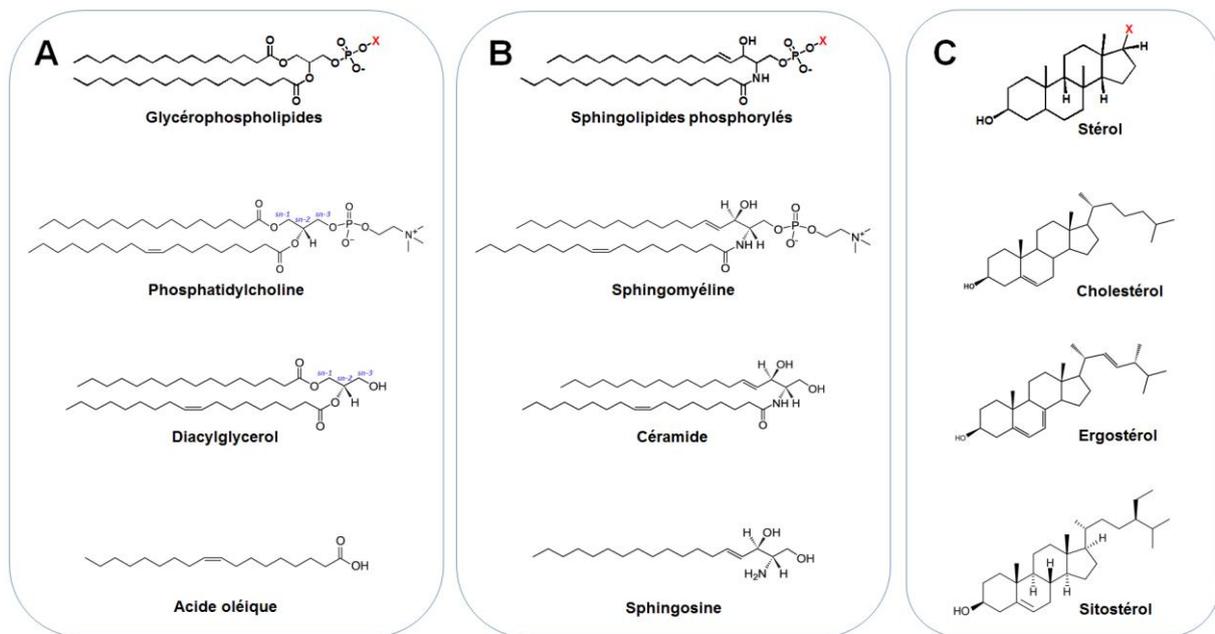


Figure 4 : Structures chimiques représentatives des glycérophospholipides (A), des sphingolipides (B) et des stérols (C), et de leurs constituants (X représente les groupements substituants qui forment la diversité des lipides).

1.2. Les glycérophospholipides

1.2.1. Structures et localisations

Les glycérophospholipides constituent généralement la fraction la plus importante des lipides cellulaires (Cf. Tableau 2). Ceux-ci constituent une famille de molécules classées en fonction de la nature de leurs têtes polaires telles que décrites par le comité international de classification et de nomenclature des lipides (Fahy *et al.*, 2009). Ainsi, comme le montre la figure 5, différentes têtes polaires peuvent être estérifiées sur le groupement phosphate des glycérophospholipides, telles que la choline ou l'éthanolamine, afin de former respectivement la PC et la phosphatidyléthanolamine (PE). De manière similaire, l'estérification sur le groupement phosphate du glycérol ou de la sérine permet de former, respectivement, le phosphatidylglycérol (PG) ou la phosphatidylsérine (PS). Enfin, l'estérification du *myo*-inositol permet de former une molécule de phosphatidylinositol (PI), précurseur de la famille des phosphoinositides (PPI).

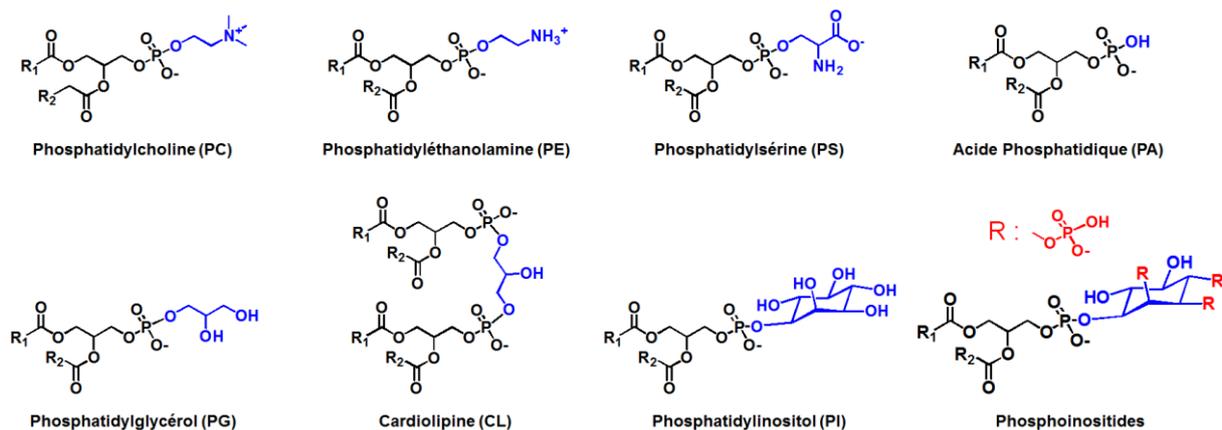


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des différents glycérophospholipides. Le substituant estérifié sur le groupement phosphate est représenté en bleu.

Il est à noter que l'estérification du substituant sur le groupement phosphate s'effectue principalement *via* une fonction alcool primaire, comme cela peut être le cas pour le glycérol, qui possède deux fonctions alcools primaires et une fonction alcool secondaire. Ainsi, l'estérification des deux fonctions alcools primaires du glycérol sur deux résidus phosphatidyles conduit à la formation d'une molécule de diphosphatidylglycérol ou cardiolipine (CL). Néanmoins, dans le cas du phosphatidylinositol, le *myo*-inositol est estérifié *via* l'une de ses fonctions alcool secondaire. Finalement, la tête polaire des glycérophospholipides peut être réduite à un simple hydrogène, permettant ainsi de former une molécule de PA.

Ces glycérophospholipides, qui possèdent des fonctions cellulaires différentes, sont représentés de manière inégale au sein des membranes en termes de proportion mais

également en termes de localisation (Figure 6) (Andreyev *et al.*, 2010, Nelson *et al.*, 2004). Ainsi, la PC et la PE sont les glycérophospholipides majoritaires des membranes cellulaires (Figure 6) (Andreyev *et al.*, 2010, Nelson *et al.*, 2004). Chez les macrophages, ces lipides sont suivis de près par le PG, présent dans toutes les membranes, ainsi que la PS que l'on retrouve notamment en quantités importantes au sein de la membrane plasmique (Figure 6) (Andreyev *et al.*, 2010, Nelson *et al.*, 2004). *A contrario*, la CL est très faiblement présente et se retrouve principalement dans les membranes mitochondriales (Andreyev *et al.*, 2010). À l'instar de la CL, le PA est très faiblement représenté dans les membranes tandis que le PI et les PPI sont retrouvés à l'état de trace (Andreyev *et al.*, 2010). Néanmoins, à l'inverse de la CL, ces glycérophospholipides sont présents dans toutes les membranes cellulaires, où ils jouent des rôles dans la signalisation cellulaire.

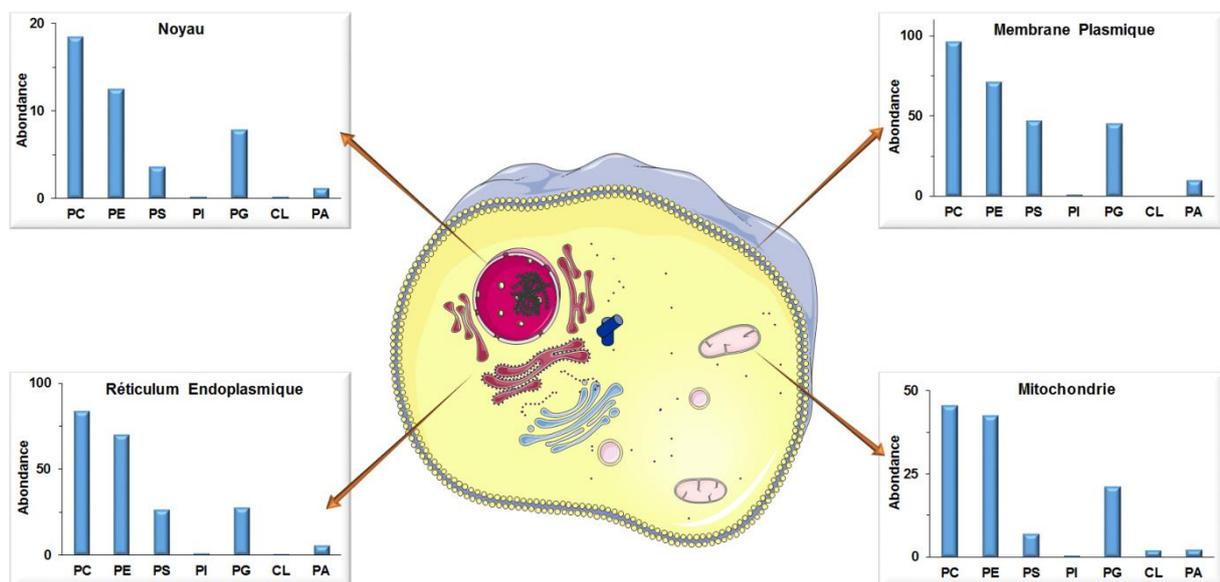


Figure 6 : Distribution cellulaire des différents glycérophospholipides au sein des membranes de macrophages de souris (Andreyev *et al.*, 2010). L'abondance des glycérophospholipides est exprimée en nmol de lipides par μg de protéines.

Par ailleurs, en plus de ces différences de localisations, les glycérophospholipides présentent aussi une distribution inégale entre les deux feuillets membranaires. Cette asymétrie a notamment été étudiée pour la membrane plasmique des érythrocytes humains (Verkleij *et al.*, 1973) en traitant les cellules par des phospholipases A_2 (PLA₂) et C (PLC). En effet, les érythrocytes constituent un modèle de choix pour l'étude de la composition de la membrane plasmique, puisque ceux-ci ne présentent pas de noyaux ni de système endomembranaire.

Ainsi, les cellules exposent généralement une proportion beaucoup plus importante de PC et de SM sur le feuillet externe de la membrane plasmique, tandis que la PE est majoritairement localisée sur le feuillet interne (Figure 7A). Par ailleurs, il est intéressant de

noter que, en conditions normales, la PS est uniquement exposée sur le feuillet interne de la membrane plasmique (Figure 7A). Cette différence est maintenue par des mécanismes de transports lipidiques entre les deux feuillets, grâce à des enzymes transmembranaires spécialisées (Figure 7B), les flippases et les floppases (Sharom, 2011).

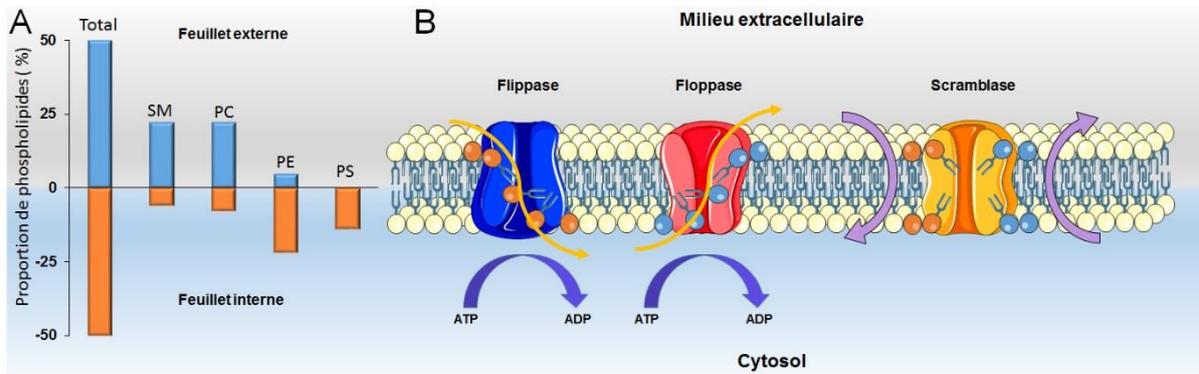


Figure 7 : (A) Asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique des érythrocytes humains (Verkleij *et al.*, 1973). (B) Mécanismes de translocation des phospholipides membranaires (Sharom, 2011).

En effet, tandis que les flippases transportent les phospholipides du feuillet externe vers le feuillet interne des membranes, les floppases catalysent le transport inverse, en transloquant les phospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe (Figure 7B). Ces enzymes permettent ainsi la création et le maintien de l'asymétrie de nombreuses membranes telle que la membrane plasmique ou encore le système endomembranaire (Sharom, 2011).

Cependant, la translocation des phospholipides, catalysée par ces enzymes, nécessite un apport d'énergie *via* l'hydrolyse d'adénosine triphosphate, source intracellulaire d'énergie, ces lipides étant transportés contre leur gradient de concentration (Figure 7B). Il est néanmoins important de noter que cette translocation d'un feuillet à l'autre peut également s'effectuer spontanément en l'absence d'énergie. Ce mécanisme, appelé flip-flop, reste néanmoins assez rare et ne s'effectue que dans le cas de lipides neutres tels que les céramides et les DAGs (Contreras *et al.*, 2010).

À l'inverse de ces mécanismes, certaines enzymes telles que les scramblases (Figure 7B), comme la hPLSCR1 (Ben-Efraim *et al.*, 2004), sont impliquées dans les distributions bidirectionnelles des phospholipides, permettant ainsi de rééquilibrer la composition des membranes. Ainsi, la hPLSCR1 permet notamment de transloquer la PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique, lors d'une augmentation cytosolique de calcium (Ben-Efraim *et al.*, 2004).

1.2.2. Rôles et propriétés biochimiques

1.2.2.1. Phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine

La PC et la PE possèdent principalement un rôle structural au sein des membranes, ceux-ci étant les glycérophospholipides majoritaires des membranes cellulaires. En effet, la PC, qui est majoritairement située sur le feuillet externe, présente une forme cylindrique tandis que la PE, majoritairement située sur le feuillet interne, présente une forme conique inversée.

Par ailleurs, ces deux glycérophospholipides sont zwitterioniques et présentent une charge neutre à pH 7 (Marsh, 1990), la charge positive de leur amine venant neutraliser la charge négative portée par le groupement phosphate (Figure 8). De plus, outre leurs rôles structuraux, ces deux lipides sont aussi les substrats préférentiels de nombreuses phospholipases cellulaires. Ainsi, leurs hydrolyses par les PLC et PLD permettent de générer respectivement du DAG et du PA, deux médiateurs lipidiques impliqués dans la signalisation cellulaire.

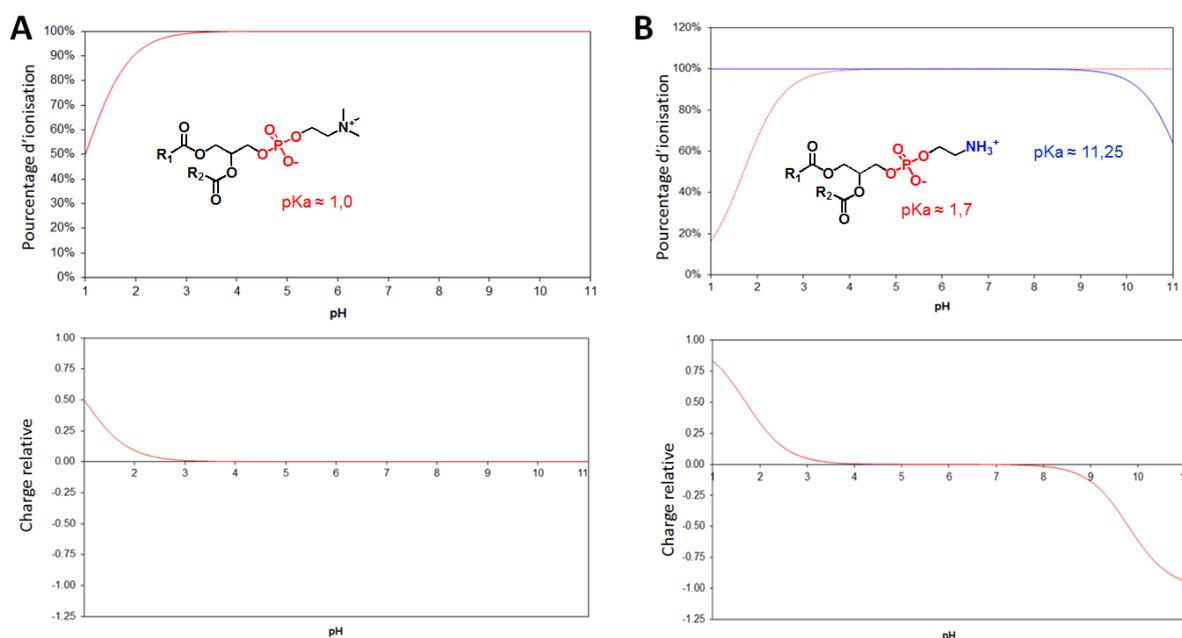


Figure 8 : Pourcentage d'ionisation et charge relative de la PC (A) et de la PE (B) en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).

1.2.2.2. Phosphatidylglycérol et cardiolipine

Le PG est généralement faiblement représenté dans les cellules animales, bien qu'il puisse être très abondant dans certains types cellulaires, tels que les macrophages (Cf. Figure 6). Ce phospholipide présente une charge relative négative à pH neutre, avec un pKa de 3,1 (Figure 9), et se localise généralement dans les membranes des mitochondries et des thylakoïdes (Cf. Figure 6).

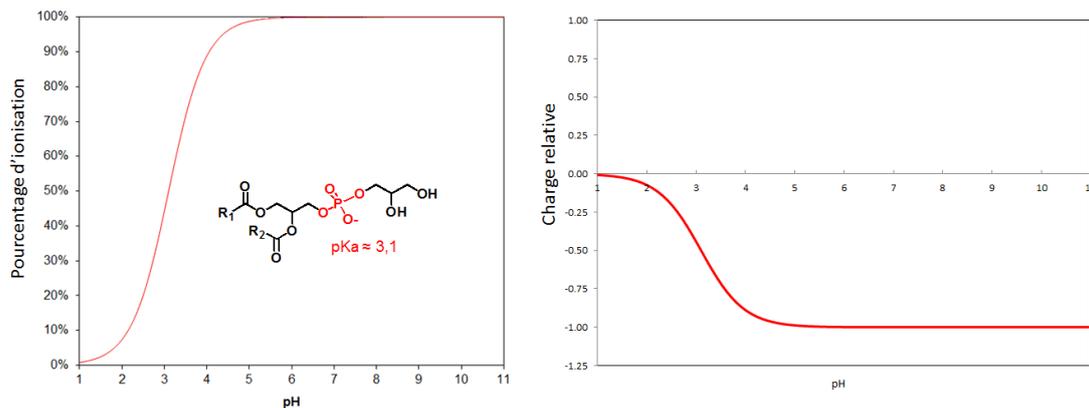


Figure 9 : Pourcentage d'ionisation et charge relative du PG en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).

Par ailleurs, ce phospholipide sert notamment de précurseur à la synthèse de la CL par la CL-synthase qui transfère un résidu phosphatidyle, d'une molécule de cytidine diphosphate diacylglycérol, sur sa fonction alcool primaire libre (Houtkooper *et al.*, 2008). La CL est presque exclusivement localisée dans la membrane mitochondriale interne, où elle joue un rôle important dans le métabolisme énergétique, en assurant notamment la stabilité des enzymes et des complexes enzymatiques, impliqués dans la production d'énergie (Houtkooper *et al.*, 2008). Par ailleurs, la CL est impliquée dans différentes étapes du processus d'apoptose par voie mitochondriale (activation des caspases) et dans la dynamique des membranes mitochondriales (Houtkooper *et al.*, 2008).

1.2.2.3. Phosphatidylinositol et phosphoinositides

À l'instar du PG, le PI est un phospholipide qui ne présente qu'une seule charge négative à pH physiologique (Figure 10), avec un pKa d'environ 2,5 (Marsh, 1990). Les PPI sont des dérivés phosphorylés du PI, qui peuvent présenter 1 à 3 groupements phosphates, estérifiés sur les groupements hydroxyles de l'inositol. Parmi les PPI, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) joue un rôle clé, en tant que médiateur lipidique, dans un nombre très important de voies de signalisation cellulaire (Kolay *et al.*, 2016).

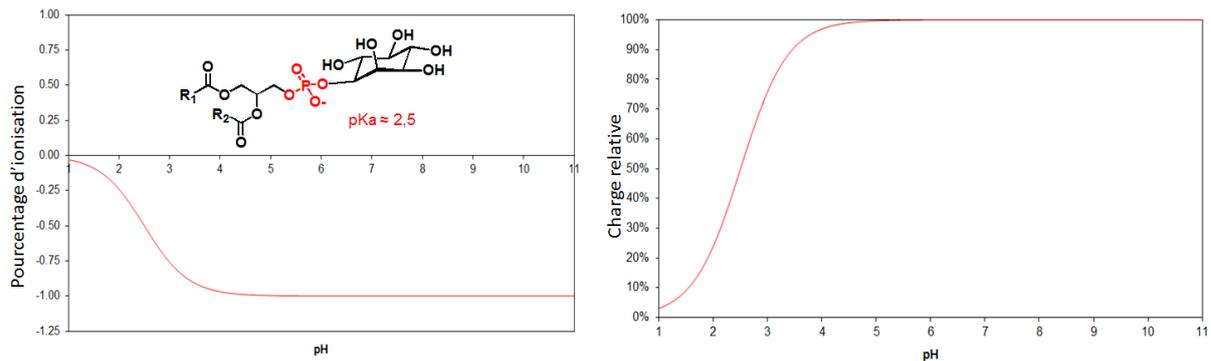


Figure 10 : Pourcentage d'ionisation et charge relative du PI en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).

1.2.2.4. Phosphatidylsérine

La PS est le phospholipide anionique le plus abondant dans les membranes eucaryotes (Cf. Figure 7A). En effet, celle-ci présente une charge négative globale à pH neutre (Figure 11), la charge positive de son amine primaire venant neutraliser l'une de ses deux charges négatives, portées par son groupement phosphate et son groupement carboxylate. Ainsi, l'état global d'ionisation de la PS varie en fonction du pH. En effet, comme le montre la figure 11, son groupement phosphate et son groupement carboxylate présente respectivement des pKa d'environ 2,6 et 5,5 (Marsh, 1990), tandis que son groupement amine présente un pKa d'environ 11,5 (Marsh, 1990).

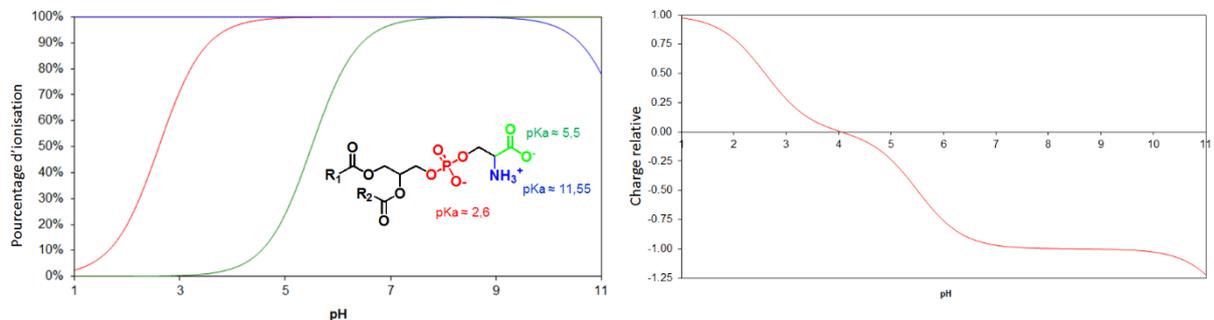


Figure 11 : Pourcentage d'ionisation et charge relative de la PS en fonction du pH, pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990).

De manière intéressante, ces valeurs de pKa diffèrent fortement de celles obtenues pour la sérine seule, qui présente des pKa de 2,2 pour groupement carboxylate et de 9,2 pour son groupement amine. Ces différences observées proviendraient, en réalité, des méthodes utilisées qui mesurent des pKa apparents et non des pKa intrinsèques. En effet, comme discuté par Tsui et collègues (Tsui *et al.*, 1986), la surface spécifique occupée par molécule de phospholipide peut varier en fonction du pH mais également en fonction de la force ionique, modifiant ainsi le potentiel de surface des membranes, lors des titrations (Tsui *et al.*, 1986). Dans cette optique, les auteurs sont ainsi parvenus à déterminer les pKa

intrinsèques de la PS, qui présentent des valeurs de 3,6 et de 9,8 pour les groupements carboxylate et amine, respectivement (Tsui *et al.*, 1986).

Ainsi, la PS est la cible privilégiée d'un nombre important de protéines membranaires ou associées, qui présentent des motifs et des domaines de fixation spécialisés (Lemmon, 2008). Certaines de ces protéines, telles que la protéine G monomérique Rho (Finkielstein *et al.*, 2006) et la tyrosine kinase Src (Sigal *et al.*, 1994), interagissent avec la PS *via* un site polycationique situé au voisinage d'un site d'ancrage à la membrane (Leventis *et al.*, 2010). Cependant, cette fixation est peu sélective et ces protéines interagissent plus généralement de manière électrostatique avec les phospholipides anioniques situés à proximité (Leventis *et al.*, 2010). Néanmoins, d'autres protéines, telles que la synaptotagmine (Sutton *et al.*, 1995) et plusieurs isoformes de la protéine kinase C (PKC) (Sutton *et al.*, 1998, Verdaguer *et al.*, 1999), interagissent de manière plus sélective avec la PS. Cette fixation s'effectue souvent de manière calcium-dépendante par l'intermédiaire de domaines spécialisés, tel que le domaine C2 et permet ainsi de les activer.

Par ailleurs, comme décrit précédemment (Cf. Figure 7A), la PS est généralement séquestrée dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Néanmoins, dans certaines circonstances celle-ci peut être exposée sur le feuillet externe de la membrane, à la surface des cellules. Ce cas peut notamment s'observer lors du phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose. En effet, contrairement à la nécrose, l'apoptose permet à l'organisme de se renouveler sans que les cellules libèrent leur contenu dans le milieu environnant. Ce processus, qui nécessite l'élimination des corps apoptotiques par les phagocytes, évite ainsi le risque de créer une inflammation des tissus environnants (Green, 2011).

Pour cela, l'exposition de la PS à la surface des cellules apoptotiques permet de les identifier comme des cibles pour la phagocytose par les cellules immunitaires (Ravichandran *et al.*, 2007). Cette exposition est le résultat de l'activation d'une scramblase associée à une inactivation concomitante d'une flippase (Cf. Figure 7B) (Balasubramanian *et al.*, 2007), bien que de récents travaux suggèrent que la PS serait également délivrée à la surface cellulaire *via* les lysosomes qui fusionnent avec la membrane plasmique au cours de l'apoptose (Mirnikjoo *et al.*, 2009). Par ailleurs, la PS apparaît également exposée à la surface des mastocytes au cours de la sécrétion d'histamine (Hosono *et al.*, 2001) ou des plaquettes sanguines durant l'hémostase, la PS étant un signal clé dans la cascade de coagulation (Williamson *et al.*, 1995).

1.2.2.5. Acide phosphatidique

Le PA est un phospholipide qui n'est que peu représenté dans la cellule, comptant pour 2 à 6% des phospholipides membranaires des cellules humaines (pré-adipocytes fibroblastiques (Shulga *et al.*, 2013) et macrophages (Andreyev *et al.*, 2010)). En effet, il s'agit d'un médiateur lipidique impliqué dans diverses voies de signalisation cellulaire (Bruntz *et al.*, 2014a), telles que la voie des MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinases*) qui est fortement impliquée dans les phénomènes de tumorigenèse (Ghosh *et al.*, 2003).

Le PA est un phospholipide particulièrement intéressant puisque sa tête polaire est uniquement composée d'un atome d'hydrogène, lié au groupement phosphate (Cf. Figure 5). Ainsi, en comparaison des autres phospholipides, le PA présente la plus petite tête polaire. Ceci lui confère une structure de forme conique (Figure 12) qui lui permet de jouer un rôle dans les phénomènes de trafic vésiculaire, en induisant une courbure négative des membranes (Kooijman *et al.*, 2005).

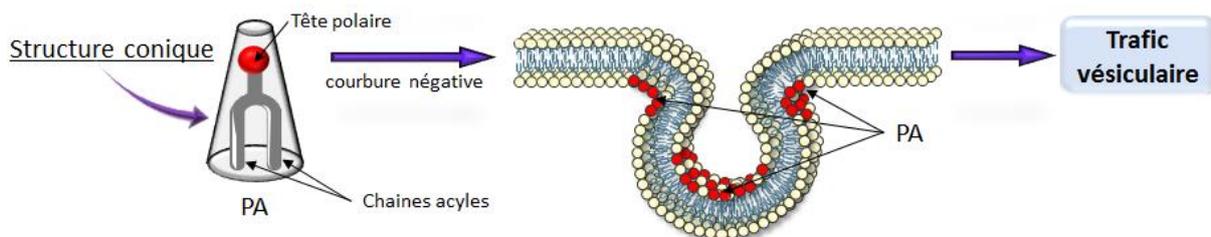


Figure 12 : Représentation schématique de la structure du PA qui permet d'induire une courbure négative des membranes.

Par ailleurs, l'état d'ionisation du groupement phosphate du PA varie en fonction du pH (Marsh, 1990) et présente un $pK_{a1} = 3$ et un $pK_{a2} = 8$ (Figure 13A). Ainsi, à pH très acide ($pH < 3$), le PA ne présente pas de charges et se trouve dans un état totalement protoné tandis que pour des pH compris entre 3 et 7, il présente une seule charge négative (Figure 13A). Enfin, à pH basique ($pH > 8$), le PA présente deux charges négatives et se trouve dans un état totalement déprotoné (Figure 13A). Néanmoins, l'état d'ionisation du PA n'est pas uniquement dépendant du pH environnant. En effet, il a été rapporté par Kooijman et collègues (Kooijman *et al.*, 2009) que la charge négative de son groupement phosphate pouvait être encore réduite lors de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires.

Ce phénomène appelé *electrostatic-hydrogen bond switch* (Kooijman *et al.*, 2009), peut notamment s'effectuer avec les résidus basiques de certaines protéines, capables de fixer le PA (Figure 13B). Ainsi, dans ce modèle, les protéines sont, dans un premier temps, recrutées à la membrane *via* une attraction électrostatique. Puis, dans un second temps, lorsque la chaîne latérale des résidus basiques se trouvent à une distance inférieure à 3,5 Å du PA, ceux-ci forment une liaison hydrogène avec le groupement phosphate qui induit sa déprotonation et aboutit à une diminution de sa charge ($-1 \rightarrow -2$). Il résulte de ce

phénomène, un verrouillage de la chaîne latérale avec le PA qui aboutit, *in fine*, à une forte fixation (Figure 13B).

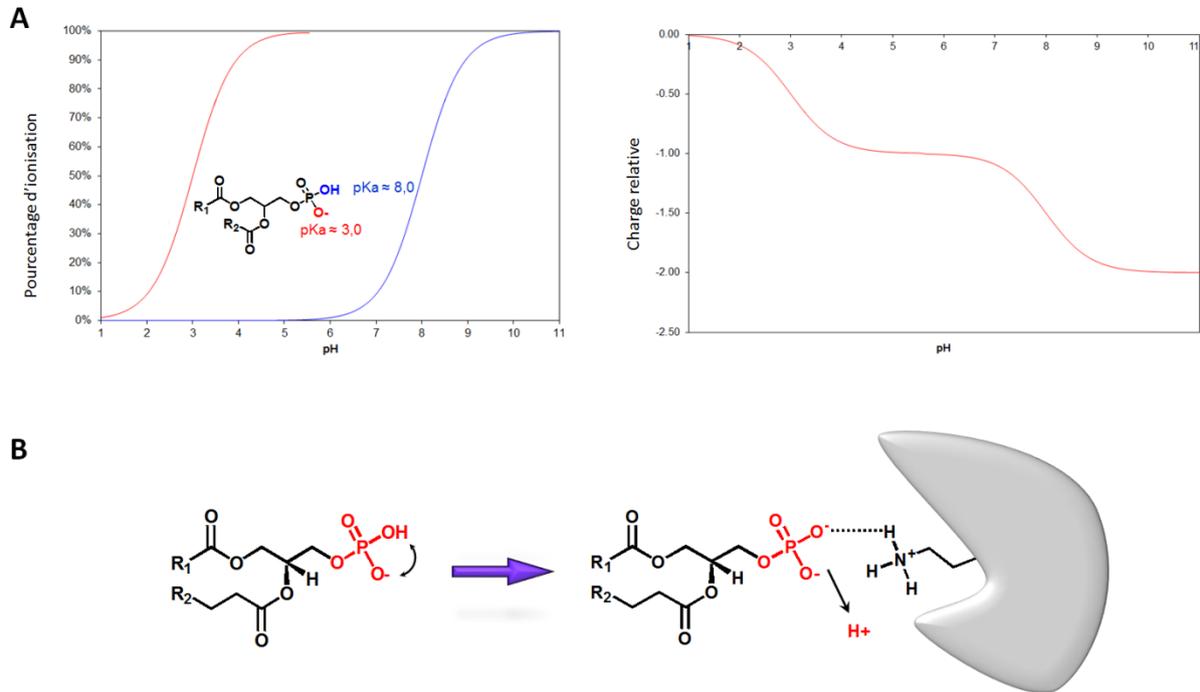


Figure 13 : (A) Pourcentage d'ionisation et charge relative du PA en fonction du pH pour une force ionique équivalente à 100 mM de NaCl, selon Marsh (1990). (B) Représentation schématique du modèle *electrostatic-hydrogen bond switch* (Kooijman *et al.*, 2009) entre le PA et la fonction amine primaire d'un résidu basique d'une protéine.

Ainsi, grâce à ses propriétés particulières, le PA est capable d'interagir avec de très nombreuses protéines associées à la membrane, tel qu'indiqué dans le tableau 3, afin de les y recruter et/ou de les activer. Ce phénomène a notamment été démontré pour plusieurs kinases mais aussi pour plusieurs PLC, phosphatases et phosphodiesterases (Tableau 3), impliquées dans des voies majeures de signalisation cellulaire. Ainsi, le PA généré par la PLD est capable d'activer la voie des MAP Kinases, notamment *via* son interaction avec la kinase Raf1 (Tableau 3 et Figure 14) (Foster *et al.*, 2003).

Cette voie présente un rôle majeur dans la cellule, en relayant les signaux captés par les récepteurs de la membrane plasmique vers le noyau et qui aboutit à la transcription de gènes, impliqués dans la mitose ainsi que dans la survie et la différenciation cellulaire. De même, *via* son interaction avec la kinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) ainsi que la kinase Akt (Tableau 3 et Figure 14), le PA formé par la PLD apparaît également être fortement impliqué dans les phénomènes de survie et de prolifération cellulaire (Hay *et al.*, 2004, Manning *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des protéines démontrées comme interagissant avec le PA, (d'après Bruntz *et al.* (2014a), avec modifications).

Nom de la protéine	Rôle du PA	Site de fixation	Références
Kinases			
Raf1	Recrutement	Résidus 339 – 423	(Ghosh <i>et al.</i> , 2003)
PKCε	Recrutement	Domaine C2	(Corbalan-Garcia <i>et al.</i> , 2003)
PKCζ	Activation	Non déterminé	(Limatola <i>et al.</i> , 1994)
PKCα	Activation	Non déterminé	(Nakashima, 2002)
PKCδ	Activation	Non déterminé	(Aris <i>et al.</i> , 1993)
mTOR	Activation	Domaine FRB (R2109)	(Veverka <i>et al.</i> , 2008)
p70S6K1	Activation	Non déterminé	(Lehman <i>et al.</i> , 2007)
PIP5K	Activation	Non déterminé	(Roach <i>et al.</i> , 2012)
Fer	Activation	Résidus R417, R425 et H426	(Itoh <i>et al.</i> , 2009)
GRK	Activation	Non déterminé	(DeBurman <i>et al.</i> , 1995)
Akt	Recrutement	Domaine PH	(Bruntz <i>et al.</i> , 2014b)
PAK1	Activation	Non déterminé	(Bokoch <i>et al.</i> , 1998)
Phosphatases			
SHP1	Activation	Région C-terminale	(Frank <i>et al.</i> , 1999)
PP1 _{cy}	Inhibition	Résidus 274–299	(Jones <i>et al.</i> , 2005)
Régulateurs des protéines G			
Rac-GDI	Inhibition	Non déterminé	(Chuang <i>et al.</i> , 1993)
n-Chimaerine	Activation	Non déterminé	(Ahmed <i>et al.</i> , 1993)
NF1	Inhibition	Non déterminé	(Bollag <i>et al.</i> , 1991)
ASAP1	Activation	Non déterminé	(Brown <i>et al.</i> , 1998)
AGAP1	Activation	Non déterminé	(Nie <i>et al.</i> , 2002)
ACAP1/2	Activation	Non déterminé	(Jackson <i>et al.</i> , 2000)
ArfGAP1/2	Activation	Non déterminé	(Randazzo, 1997)
RA-RhoGAP	Activation	Résidu R399	(Kurooka <i>et al.</i> , 2011)
RSS4	Inhibition	Région N-terminale	(Ouyang <i>et al.</i> , 2003)
SOS	Recrutement	Résidus R475 et R479	(Zhao <i>et al.</i> , 2007)
DOCK2	Recrutement	Région C-terminale	(Nishikimi <i>et al.</i> , 2009)
Phosphodiesterases			
PDE4D3	Activation	Résidus 31–59	(Grange <i>et al.</i> , 2000)
PDE4B1	Activation	Non déterminé	(Nemoz <i>et al.</i> , 1997)
PDE4A5	Activation	Non déterminé	(El Bawab <i>et al.</i> , 1997)
PDE4A1	Recrutement	Région N-terminale	(Baillie <i>et al.</i> , 2002)
PLC			
PLCβ1	Activation	Résidus Y952 et L955	(Litosch, 2003)
PLCγ1	Activation	Non déterminé	(Jones <i>et al.</i> , 1993)
PLCε	Activation	Non déterminé	(Murthy <i>et al.</i> , 2006)
PLCδ3	Activation	Non déterminé	(Pawelczyk <i>et al.</i> , 1999)
Divers			
NADPH oxydase	Activation	Sous-unité p47 ^{phox}	(Karathanassis <i>et al.</i> , 2002)
neurogranine	Recrutement	Non déterminé	(Baudier <i>et al.</i> , 1991)
β-Cotomer	Non déterminée	Non déterminé	(Manifava <i>et al.</i> , 2001)
Af1/6	Non déterminée	Non déterminé	(Manifava <i>et al.</i> , 2001)
NSF	Non déterminée	Non déterminé	(Manifava <i>et al.</i> , 2001)
Kinésine	Non déterminée	Non déterminé	(Manifava <i>et al.</i> , 2001)
Sin1	Recrutement	Domaine PH	(Schroder <i>et al.</i> , 2007)
Anc	Non déterminée	Non déterminé	(Epanand <i>et al.</i> , 2009)
Rac1	Recrutement	C-terminal polybasique motif	(Chae <i>et al.</i> , 2008)

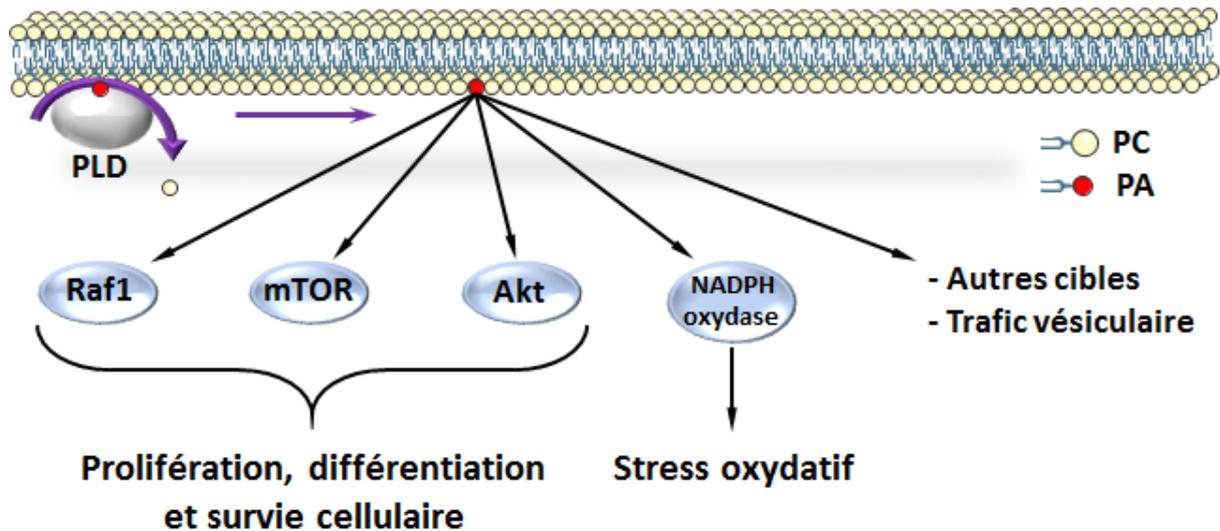


Figure 14 : Exemples de cibles cellulaires activées par le PA, aboutissant aux phénomènes de stress oxydatif ainsi que de prolifération, de différenciation et de survie cellulaire.

Par ailleurs, le PA a également été rapporté être un activateur de la NADPH oxydase (Karathanassis *et al.*, 2002), *via* son interaction avec la sous-unité p47^{phox} (Tableau 3 et Figure 14), impliquée dans la synthèse d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ainsi, le PA et *a fortiori* la PLD, sont impliqués dans les phénomènes de stress oxydatifs chez l'humain (Giron-Calle *et al.*, 2000) mais également chez les plantes (Taylor *et al.*, 1997).

1.2.3. Organisation des phospholipides en milieu aqueux

Les phospholipides étant des molécules amphiphiles, ceux-ci ont tendance à s'auto-organiser, lorsqu'ils sont mis au contact d'une phase aqueuse. En effet, les chaînes acyles, qui sont hydrophobes, vont interagir les unes avec les autres, de manière à ne pas être en contact avec les molécules d'eau. À l'inverse, les têtes polaires qui sont, elles, hydrophiles seront directement au contact de la phase aqueuse. Ceci permet ainsi aux phospholipides de s'organiser de manière à former des films monomoléculaires ou des vésicules.

1.2.3.1. Les films monomoléculaires

Les phospholipides n'étant pas miscibles à l'eau, lorsqu'ils sont déposés à la surface d'un tampon aqueux, ceux-ci restent à l'interface air-tampon, comme le montre la figure 15. Les chaînes acyles étant hydrophobes, les phospholipides vont s'organiser de manière à mettre leurs têtes polaires au contact de la phase aqueuse, tandis que leurs parties hydrophobes seront orientées vers l'air.

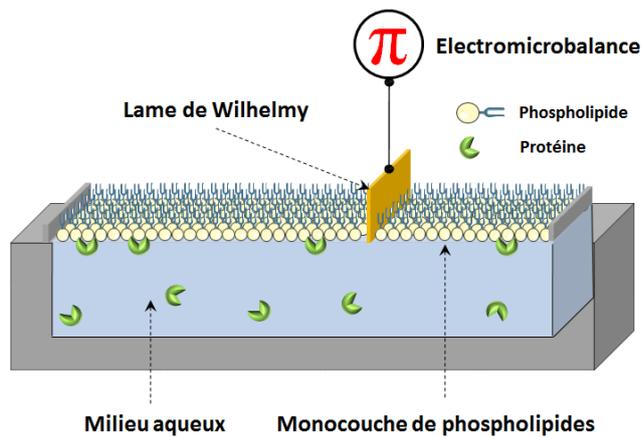


Figure 15: Représentation schématique de l'organisation sous forme de films monomoléculaires des phospholipides à l'interface air-tampon.

L'électromicrobalance permet la détermination de l'adsorption / pénétration de protéines membranaires à l'interface air / eau, par mesure de la pression de surface.

Ce type d'organisation permet notamment d'étudier la surface occupée par les phospholipides en fonction de leur composition en chaînes acyles et de leurs têtes polaires. Par ailleurs, il est possible de mesurer une pression de surface (π) qui s'effectue typiquement grâce à une lame reliée à une électromicrobalance, par la méthode de Wilhelmy (Wilhelmy, 1863), lors de la compression du film lipidique à l'aide d'une barrière mobile en Téflon. Ceci permet, par ailleurs, d'évaluer la pénétration de protéines membranaires (périphériques, Cf. Figure 3) afin de déterminer leurs capacités à interagir avec les membranes (Figure 15).

1.2.3.2. Les vésicules lipidiques

Lorsqu'ils sont en milieu aqueux, les phospholipides sont aussi capables de s'organiser sous forme de vésicules. On en distingue deux types que sont les liposomes et les micelles.

➤ Les liposomes

Les phospholipides possédant deux chaînes acyles, ceux-ci peuvent s'organiser en bicouches lipidiques closes, sphériques et concentriques en exposant leurs têtes polaires au contact de l'eau, créant ainsi un espace intra-vésiculaire. Ces vésicules peuvent atteindre différentes tailles comme le montre la figure 16, et sont classées en :

- SUV : *Small Unilamellar Vesicles*, ce sont des liposomes qui présentent des tailles de 15 à 50 nm. Ces liposomes sont généralement préparés par extrusion ou sonication.
- LUV : *Large Unilamellar Vesicles*, ce sont des liposomes qui présentent des tailles comprises entre 200 nm et 1 μm et qui peuvent présenter plusieurs couches, formant ainsi des MLV (*Multi-Lamellar Vesicles*).
- GUV : *Giant Unilamellar Vesicles*, ce sont des liposomes qui présentent des tailles supérieures à 1 μm et qui sont par conséquent visibles par microscopie optique.

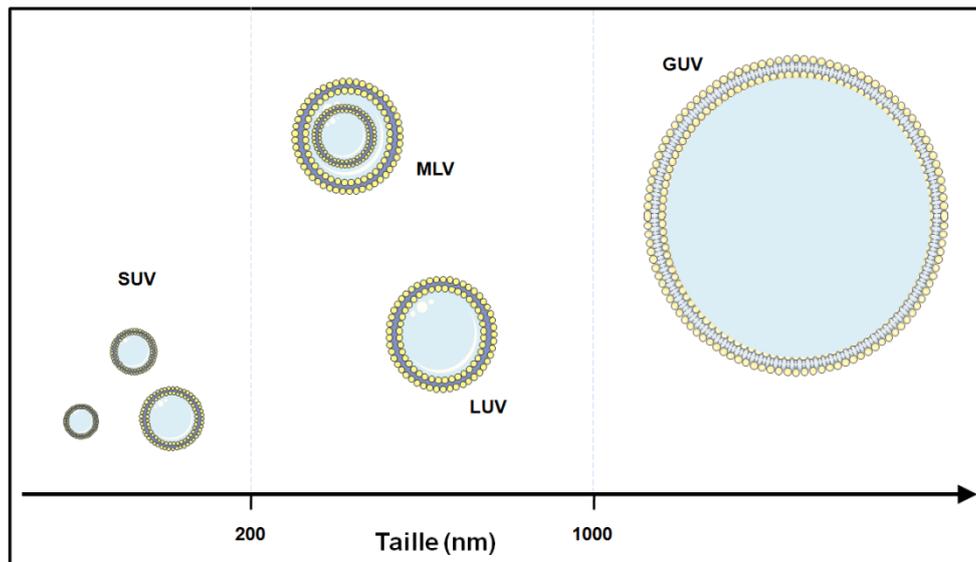


Figure 16 : Classification des différents types de liposomes en fonction de leurs tailles.

➤ **Les micelles**

À l'inverse des liposomes, les micelles sont des agrégats sphériques composées d'une seule couche de lipides amphiphiles, dont le cœur hydrophobe est formé par les chaînes acyles, tandis que leur surface est composée de groupements hydrophiles (Figure 17A). Les micelles sont généralement formées par des molécules composées d'une seule chaîne acyle, telle que les acides gras, les lysophospholipides, les monoglycérides ainsi que certains détergents.

Ainsi, lorsqu'elles sont en solution, ces molécules restent sous forme de monomères jusqu'à une certaine concentration, appelée CMC ou concentration micellaire critique (Figure 17B). La valeur de la CMC est propre à chaque lipide et dépend, par ailleurs, de plusieurs paramètres, tels que la température et la force ionique de la solution (Dominguez *et al.*, 1997). Au-delà de cette concentration, ces molécules tendent à s'agréger entre elles afin de former des micelles, qui présentent généralement des diamètres hydrodynamiques compris entre 5 et 10 nm (Lopez *et al.*, 1998).

L'une des propriétés les plus remarquables des micelles réside dans leur capacité à solubiliser, sous forme d'émulsion, les lipides complexes hydrophobes, tels que les triglycérides. En effet, cette propriété est notamment mise à contribution lors du processus de digestion, durant lequel les acides biliaires solubilisent les graisses alimentaires, permettant notamment d'augmenter la surface de contact avec les lipases digestives. Par ailleurs, les micelles permettent aussi de solubiliser les lipides complexes amphiphiles, tels que les phospholipides (Figure 18A).

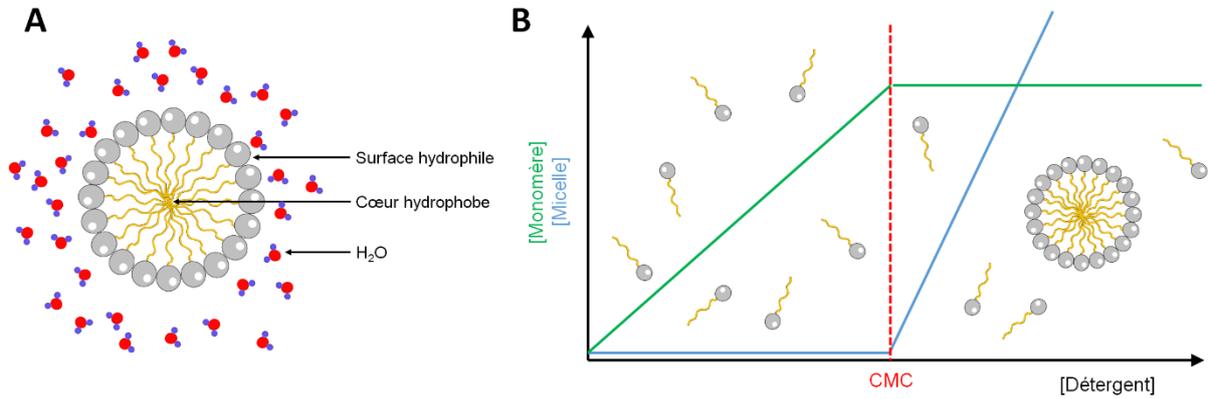


Figure 17 : (A) Représentation schématique de l'organisation sous forme de micelles en milieu aqueux. (B) Formation de micelles en fonction de la concentration en détergents.

En effet, bien qu'en milieu aqueux les phospholipides s'organisent en bicouches (Cf. Figure 16), il est néanmoins possible de former des micelles mixtes grâce à l'addition de détergents. Ces micelles présentent elles aussi des diamètres hydrodynamiques compris entre 5 et 10 nm (Lopez *et al.*, 1998). Ces micelles mixtes sont notamment utilisées dans l'étude des phospholipases, en utilisant des détergents anioniques, tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS), ou neutres, tels que le Triton X-100 (Figure 18B).

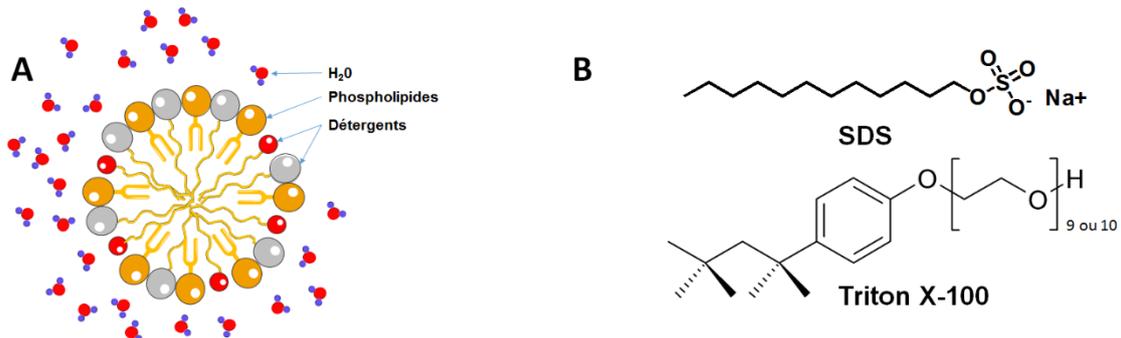


Figure 18 : (A) Représentation schématique de la solubilisation de phospholipides sous forme de micelles mixtes par des détergents en milieu aqueux. (B) Structure du SDS et du Triton X-100.

1.3. Les phospholipases

Au travers de la production de médiateurs lipidiques, les membranes cellulaires constituent un haut lieu d'échange et de transduction des signaux cellulaires, dont le caractère dynamique est majoritairement contrôlé par l'action des phospholipases. En effet, ces enzymes lipolytiques sont capables de s'adsorber aux membranes et peuvent ainsi hydrolyser leurs substrats afin de produire des métabolites bioactifs. Il existe quatre types de phospholipases, capables d'hydrolyser les phospholipides membranaires : la phospholipase A₁ (EC 3.1.1.32 - PLA₁), la phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4 - PLA₂), la PLC (EC 3.1.4.3) et la PLD (EC 3.1.4.4) (Figure 19).

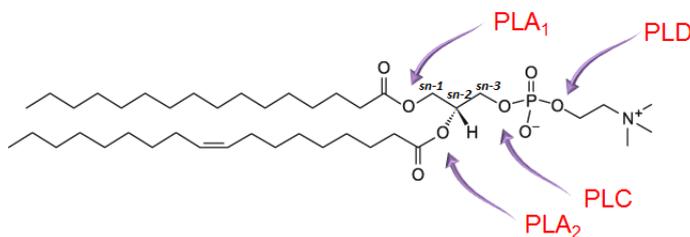


Figure 19 : Spécificité d'hydrolyse des phospholipases sur la PC.

1.3.1 Les phospholipases A

Les PLA₁ et PLA₂ hydrolysent respectivement les liaisons esters en position *sn-1* et *sn-2* des glycérophospholipides afin de produire un lysophospholipide et de libérer l'acide gras libre correspondant (Figure 19). Les PLA₁ présentent de nombreuses fonctions cellulaires, telles que le renouvellement rapide de phospholipides membranaires, mais aussi physiologiques, telles que l'agrégation plaquettaire et la contraction des muscles lisses (Inoue *et al.*, 2005). Chez les plantes, les PLA₁ seraient, entre autres, responsables de la libération d'acide linoléique, précurseur de la synthèse d'acide jasmonique (Ishiguro *et al.*, 2001).

Les PLA₂ sont, quant à elles, réparties en six principaux groupes chez les mammifères (Dennis *et al.*, 2011). On distingue notamment les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂ - groupe IV), les PLA₂ indépendantes du calcium (iPLA₂ - groupe VI), les acétylhydrolases du facteur d'activation plaquettaire (PAF AHS - groupe VII et groupe VIII), les PLA₂ lysosomales (groupe XV), les PLA₂ du tissu adipeux (groupe XVI) ainsi que plusieurs groupes de PLA₂ sécrétées (sPLA₂). La plupart de ces enzymes n'ont aucune similitude structurale, et ont des mécanismes de régulation et de catalyse différents. Ainsi, tandis que les cPLA₂ et les iPLA₂ présentent une dyade catalytique composée des résidus Ser-Asp, d'autres PLA₂ possèdent un résidu His dans leur site actif (Dennis *et al.*, 2011). Parmi les nombreux rôles des PLA₂, le plus caractérisé est sans conteste la libération de l'acide arachidonique qui est un précurseur de la synthèse d'eicosanoïdes, médiateurs de l'inflammation (Dennis *et al.*, 2011).

1.3.2. La phospholipase C

La PLC hydrolyse, quant à elle, la liaison phosphodiester proximale des glycérophospholipides, permettant ainsi de générer une molécule de DAG et de libérer le groupement phosphate lié à la tête polaire (Figure 19). La PLC est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire notamment en libérant une molécule d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) lors de l'hydrolyse du PIP₂. En effet, le DAG et l'IP₃ sont des seconds messagers importants qui contrôlent divers processus cellulaires, le DAG étant, par ailleurs, un substrat pour la synthèse d'autres molécules, telles que le PA, synthétisé par la DAG kinase. Ainsi, tandis que le DAG reste ancré à la membrane, après hydrolyse du PIP₂, l'IP₃ est libéré dans le cytosol et diffuse ensuite afin de se lier à ses récepteurs, tels que les canaux calciques du RE. Ceci provoque ainsi une augmentation de la concentration cytosolique de calcium et induit une cascade de changements de l'activité intracellulaire (Kadamur *et al.*, 2013). En outre, le calcium ainsi que le DAG néo-synthétisé permettent d'activer certaines PKC, qui en phosphorylant leurs cibles, vont à leur tour activer plusieurs voies de signalisation cellulaire (Kadamur *et al.*, 2013).

1.3.3. La phospholipase D

À l'inverse des PLA₁, PLA₂ et de la PLC, la PLD hydrolyse, quant à elle, la liaison phosphodiester distale des phospholipides membranaires (Figure 19). Son action permet ainsi de libérer la tête polaire du phospholipide substrat, telle que la choline dans le cas de l'hydrolyse de la PC, tandis que le résidu phosphatidyle reste ancré dans la membrane, sous la forme d'une molécule de PA (Figure 20). Par ailleurs, en plus de la réaction d'hydrolyse, la PLD est capable de catalyser la réaction de transphosphatidylation, qui consiste en l'échange de la tête polaire du phospholipide substrat par une autre tête polaire (Figure 20). Cette seconde réaction fait intervenir un alcool primaire qui sert d'accepteur nucléophile et qui est transféré sur le résidu phosphatidyle, conduisant finalement à la formation du phosphatidyl-alcool correspondant (Yang *et al.*, 1967), tel qu'indiqué dans la figure 20.

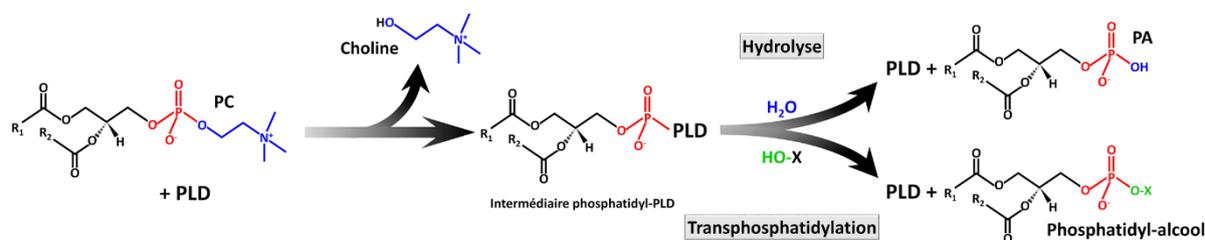


Figure 20 : Schéma des réactions d'hydrolyse ou de transphosphatidylation, catalysées par la PLD sur la PC substrat, formant respectivement du PA ou un phosphatidyl-alcool.

Historiquement, la PLD a été découverte chez les plantes dont les extraits protéiques présentent une activité importante. En effet, l'activité PLD a, pour la première fois,

été décrite chez la carotte (Hanahan *et al.*, 1947) puis utilisée comme biocatalyseur par plusieurs chimistes dans la synthèse de nouveaux phospholipides, en utilisant son activité transphosphatidylase (Dawson, 1967, Eibl *et al.*, 1981). Néanmoins, à cette époque, la PLD était utilisée sous forme d'extraits bruts ou partiellement purifiés à partir de sources végétales telles que le chou blanc (Dawson *et al.*, 1967, Juneja *et al.*, 1987, Juneja *et al.*, 1989, Long *et al.*, 1967). Il aura ainsi fallu attendre les années 1990 pour que la purification et la caractérisation des PLDs prennent une réelle ampleur (Abousalham *et al.*, 1993, Abousalham *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1993) et conduise finalement au premier clonage du gène de la PLD α , à partir de *Ricinus communis* (Wang *et al.*, 1994).

Ces travaux ont ainsi été les prémices de la caractérisation des PLDs d'autres organismes, telles que les PLDs de bactéries (Iwasaki *et al.*, 1994), de levures (Honigberg *et al.*, 1992) et de virus (Koonin, 1996). Mais ce sont néanmoins les PLDs de mammifères qui ont été l'objet du plus vif intérêt, avec notamment le premier clonage d'une PLD humaine en 1995 (Hammond *et al.*, 1995). En effet, chez l'Homme et d'une manière plus générale chez les mammifères, la PLD apparaît comme une enzyme clé de la signalisation cellulaire et ses caractérisations biochimiques et structurales représentent un enjeu important, notamment en santé humaine. Ce rôle de la PLD est principalement attribué aux effets induits par son produit de réaction, le PA, qui est un médiateur lipidique impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire (Cf. 1.2.2.5.). Ainsi, il a notamment été démontré que la PLD, *via* le PA, est impliquée dans un nombre important de processus cellulaires et physiologiques clés, tels que le trafic vésiculaire, le stress oxydatif, la prolifération cellulaire, l'invasion tissulaire et l'agrégation plaquettaire (Selvy *et al.*, 2011). Par conséquent, la PLD a été démontrée comme étant impliquée dans de nombreuses pathologies, telles que l'inflammation, la thrombose ainsi que certaines maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer (Selvy *et al.*, 2011) ou encore dans plusieurs cancers, tels que le cancer du sein (Henkels *et al.*, 2013), du rein (Zhao *et al.*, 2000), du cerveau (Park *et al.*, 2009) et du colon (Saito *et al.*, 2007), où l'on y observe une activité aberrante.

La superfamille des PLDs est constituée d'un nombre très important de membres qui présentent des différences en termes de séquences, de structures, de localisations cellulaires ainsi que de spécificité de substrats. Les travaux de recherche cités précédemment ont ainsi permis une meilleure caractérisation de cette superfamille qui, alliée à l'avènement des techniques de séquençages nucléiques à haut débit, ont conduit à l'identification d'homologues dans un large éventail d'organismes. En effet, on dénombre à ce jour plus de 8 500 entrées de gènes appartenant à la superfamille des PLDs, dans la base de données GenBank (NCBI).

Ces gènes proviennent de divers organismes d'origines procaryotes (bactéries et Archaea), eucaryotes (animaux, plantes et levures) ainsi que de virus. Ces membres sont plus généralement séparés en deux groupes distincts, constitués d'une part des PLDs à séquence consensus « HKD », qui ont en commun le motif (HXKX₄D) (x étant un acide aminé quelconque) et qui est dupliqué dans la plupart des membres de la superfamille des PLD, et d'autre part des PLDs dépourvues de séquence consensus HKD qui, à l'inverse du premier groupe, ne présentent aucune homologie de séquence en acides aminés.

1.4. La superfamille des PLDs

1.4.1. Les PLDs à séquence consensus HKD

Dans cette superfamille, tous les membres constituant la catégorie des PLDs à séquence consensus HKD, qu'ils soient d'origine eucaryote ou procaryote, présentent généralement quatre régions communes. Ces régions, notées de I à IV (Figure 21), sont très conservées et contiennent notamment les résidus HKD (histidyl, lysyl et aspartyl) directement impliqués dans la catalyse, tel que décrit par Sung et collègues (Sung *et al.*, 1997). Par ailleurs, dans la majorité des PLDs eucaryotes, on peut également observer la présence d'un ou de plusieurs domaines régulateurs, propres à chaque type de PLD et situés en position N-terminale (Figure 21).

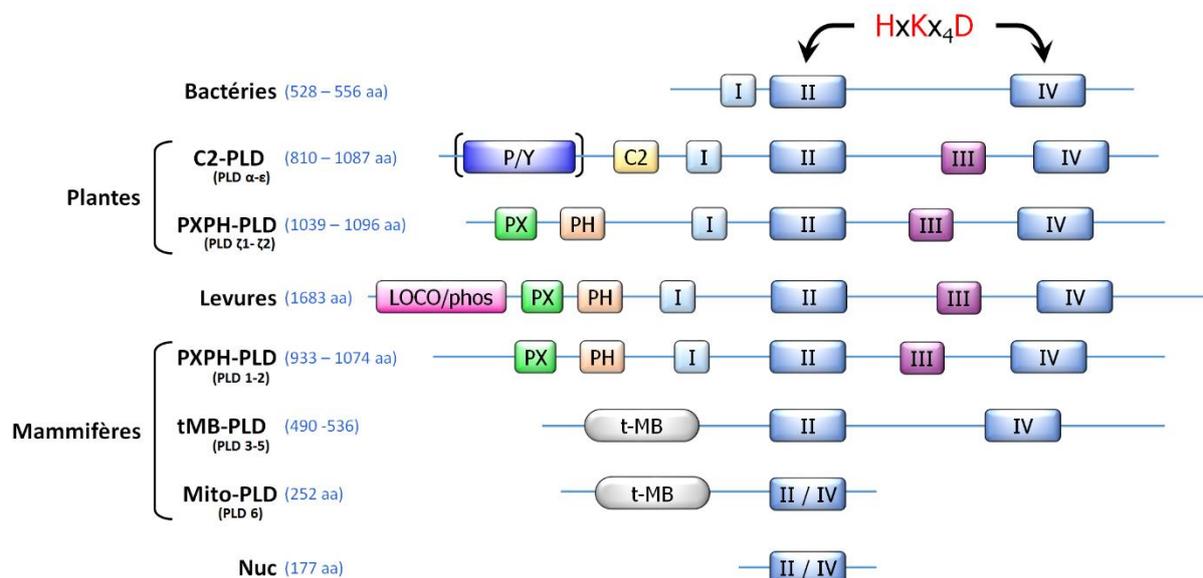


Figure 21 : Représentation schématique des domaines présents chez les PLDs de bactéries, plantes, levures, mammifères et l'endonucléase Nuc. Les domaines notés de I à IV correspondent aux séquences conservées, telles que décrites par Sung *et al.* (1997) ; C2 : domaine C2 ; P/Y : domaine riche en prolines et en tyrosines ; PX : domaine Phox, PH : domaine d'homologie à la Pleckstrine ; LOCO/phos : domaine de localisation aux endosomes ; t-MB : domaine transmembranaire. MitoPLD : PLD des membranes externes de la mitochondrie ou PLD6.

Cependant, il est à noter que le consensus HKD est également retrouvé dans d'autres enzymes, telles que des CL-synthases et des phosphatidylsérine synthases (Morris *et al.*, 1996), qui catalysent respectivement les réactions de synthèse de CL et de PS, ainsi que dans les protéines de l'enveloppe de certains virus et dans plusieurs endonucléases (Ponting *et al.*, 1996). Dans l'endonucléase Nuc, issue de *Salmonella typhimurium*, ce consensus interviendrait ainsi dans l'hydrolyse de la liaison phosphodiester du squelette nucléique d'une manière analogue à l'hydrolyse de cette liaison dans les phospholipides.

1.4.1.1. Distribution des PLDs à consensus « HKD »

À ce jour, on dénombre au moins 6 isoformes de PLD humaines, pouvant elles-mêmes faire l'objet d'épissages alternatifs. Ainsi, le gène *PLD1* code deux isoformes de cette enzyme, les PLD1a (1 074 résidus) et PLD1b (1 036 résidus), qui diffèrent par la présence d'une boucle régulatrice interne. Ces enzymes se localisent en conditions normales au niveau des membranes péri-nucléaires telles que les endosomes précoces et l'appareil de Golgi (Hughes *et al.*, 2001). Concernant la PLD2, celle-ci présente une taille plus réduite (933 résidus) et se localise principalement au niveau de la membrane plasmique, où elle participe à de nombreuses voies de signalisation cellulaire (Peng *et al.*, 2012). Les PLD3 (Osisami *et al.*, 2012) et PLD4 (Otani *et al.*, 2011) sont, quant à elles, localisées à la membrane du RE où elles y sont ancrées *via* une hélice transmembranaire, leur extrémité N-terminale étant cytosolique et leurs domaines catalytiques luménaux. Concernant la PLD5, celle-ci présente, à l'instar des PLD3 et PLD4, une hélice transmembranaire (Frohman, 2015). Néanmoins, aucune caractérisation n'a été entreprise à ce jour pour cette isoforme, celle-ci ne présentant, par ailleurs, aucune conservation du site catalytique canonique (Frohman, 2015). Enfin, la PLD6 ou MitoPLD, est une PLD dimérique localisée sur la membrane externe de la mitochondrie, *via* deux hélices transmembranaires (Choi *et al.*, 2006). Cette isoforme hydrolyserait la CL (Ha *et al.*, 2014) mais présenterait également une activité endonucléasique, à l'instar de Nuc, afin de générer une forme spécialisée de micro-ARN appelé *piwi-interacting RNA* (piRNA) (Watanabe *et al.*, 2011), impliqué dans l'extinction génique d'éléments mobiles, présents dans l'ADN, tels que les transposons, dans les cellules germinales et l'embryon (Malone *et al.*, 2009).

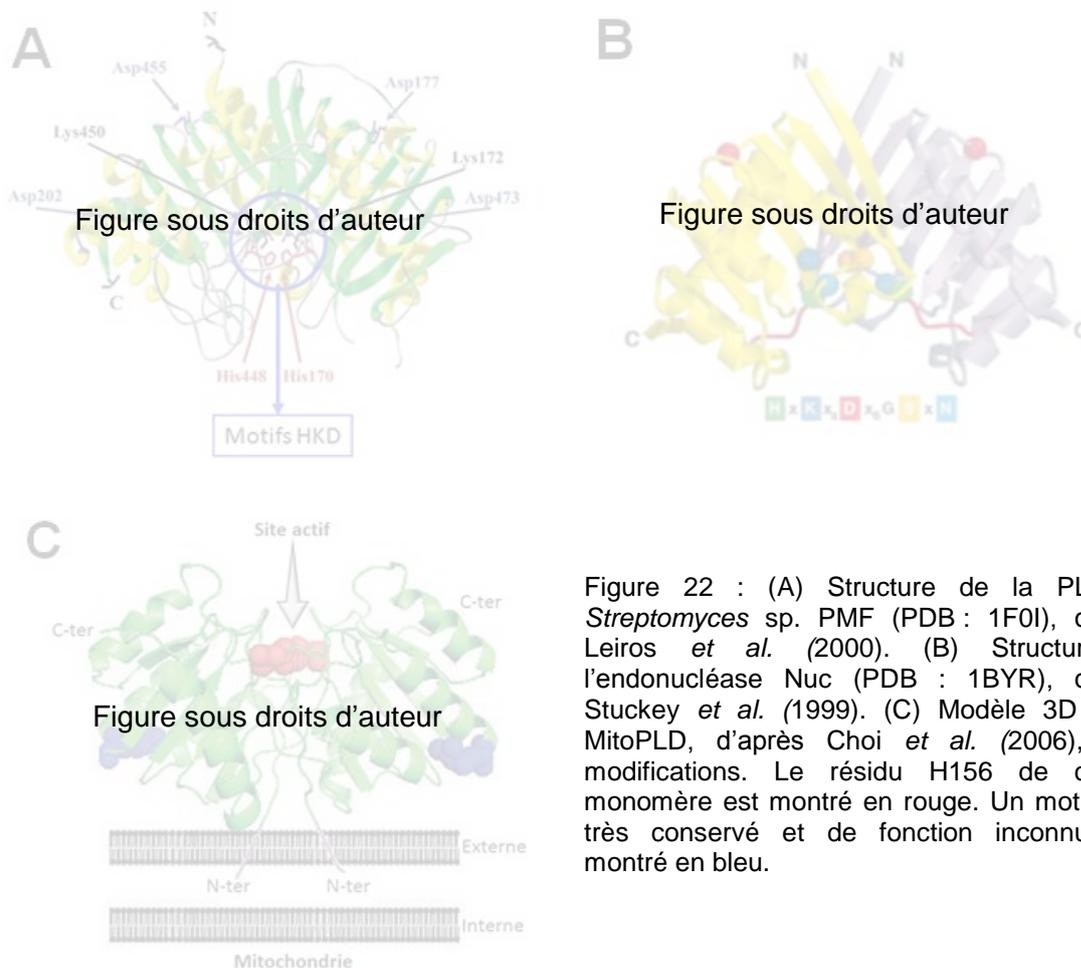
Parmi les PLDs bactériennes à consensus HKD, celle de *Streptomyces* souche PMF est la mieux caractérisée. En effet, la structure de cette PLD (54 kDa) a été déterminée avec une résolution de 1.9 Å et affinée à 1.4 Å (Leiros *et al.*, 2000). De manière similaire, parmi les PLDs de levures, SPO14 est la PLD la mieux caractérisée. Cette PLD est produite par *Saccharomyces cerevisiae* et intervient notamment lors de la méiose (Rudge *et al.*, 2002). Enfin, les plantes présentent un grand nombre d'isoformes allant de 12, chez

Arabidopsis thaliana, jusqu'à 17 chez *Oryza sativa*. Les PLDs de plantes faisant l'objet de cette thèse, les rôles des différentes isoformes seront détaillés un peu plus loin dans ce manuscrit (Cf. 1.5).

1.4.1.1.1. Les régions conservées II et IV (site catalytique)

Concernant les séquences conservées entre les PLDs (Figure 21), les régions II et IV comprennent les résidus HxKx₄D qui sont directement responsables de la catalyse et qui forment le consensus HKD (Selvy *et al.*, 2011). Par ailleurs, pour être fonctionnelles, ces régions doivent nécessairement se replier de manière à joindre leurs motifs HKD et ainsi former le site catalytique. En effet, cette condition, *sine qua non* à la catalyse, a notamment été démontrée lors la co-expression de la partie N-terminale de la PLD1 de rat (comprenant le premier consensus HKD) avec sa partie C-terminale (comprenant le second consensus HKD), restaurant ainsi l'activité PLD *in cellulo* (Xie *et al.*, 1998, Xie *et al.*, 2000).

Ainsi, les PLDs à consensus HKD adoptent généralement une conformation dite en « selle de cheval » qui leur permet de former un motif catalytique complet, en réunissant leurs résidus catalytiques. Cette configuration particulière est notamment observable sur la structure tridimensionnelle (3D) de la PLD de *Streptomyces* sp. (Figure 22A), dont la topologie est, par ailleurs, similaire à celle obtenue pour la structure de l'endonucléase Nuc (Figure 22B) (Stuckey *et al.*, 1999). Ces structures ont ainsi permis de mettre en exergue l'implication des différents résidus des consensus HKD dans la catalyse. En effet, l'endonucléase Nuc, qui ne contient qu'un seul consensus HKD (voir Figure 21), cristallise sous forme d'un dimère afin de former la structure de type « selle de cheval » permettant ainsi d'hydrolyser la liaison phosphodiester du squelette phosphorylé de l'ADN, *via* les résidus catalytiques du site actif (Stuckey *et al.*, 1999). La nécessité de réunir les deux motifs HKD est également démontrée avec la MitoPLD (Figure 22C) qui, à l'instar de Nuc, n'est active que sous forme de dimère. En effet, cette PLD, qui présente une hélice transmembranaire, s'ancre à la membrane externe des mitochondries afin de pouvoir se dimériser et ainsi former son site catalytique (Choi *et al.*, 2006).



1.4.1.1.2. Les régions conservées I et III

De manière similaire aux régions II et IV, la région I est conservée entre tous les homologues de PLDs. Cette région présente notamment une leucine dont la mutation en aspartate entraîne une perte totale de l'activité chez la PLD1 humaine (Sung *et al.*, 1997). La région III, également appelée motif "IYIENQFF", est située entre les deux consensus HKD (région II et IV). Cette région se retrouve très conservée entre les PLDs de plantes, les PLDs de levures ainsi que les PLD1 et PLD2 humaines mais est absente des PLDs bactériennes (Sung *et al.*, 1997). Le rôle précis de cette région n'a pas encore été déterminé, bien qu'elle puisse être impliquée dans la fixation de la PC, *via* ses résidus aromatiques. Ainsi, les études de mutagenèse dirigée sur la PLD1 ont démontré que cette région était presque aussi critique que les consensus HKD (Sung *et al.*, 1997). En effet, cette région est également présente dans certaines choline estérases où elle permet de stabiliser le complexe en fixant la choline, *via* des résidus aromatiques, tandis que l'hydrolyse est effectuée par le site catalytique (Gilson *et al.*, 1994). Néanmoins, une seconde hypothèse suggère, quant à elle, que cette région serait impliquée dans l'adressage des PLDs aux cavéoles (Qin *et al.*, 2002).

1.4.1.1.3. Séquence C-terminale

Bien qu'elle ne constitue pas un domaine autonome, la partie C-terminale des PLDs jouerait un rôle important dans l'activité catalytique. En effet, cette région est notamment très conservée dans les PLDs de plantes et induit une perte totale de l'activité catalytique de la PLD α de chou, *in vitro*, lors de la mutation de certains de ses résidus (Lerchner *et al.*, 2006). À l'instar des PLDs de plantes, les PLD1 et PLD2 humaines partagent une homologie importante pour cette région. Ainsi, Liu et collègues (Liu *et al.*, 2001) ont montré que la mutation ou la délétion de certains résidus de leur extrémité C-terminale induisait, de manière similaire aux PLDs de plantes, une réduction de leurs activités catalytiques. Il a donc été proposé que les résidus situés à cette extrémité interagissent directement avec le site actif des PLDs. Cette hypothèse est, par ailleurs, supportée par les travaux de Steed et collègues (Steed *et al.*, 1998) qui ont identifié un variant d'épissage présentant une extrémité C-terminale tronquée et exhibant une activité catalytique réduite.

1.4.1.1.4. Les domaines régulateurs

Selon les espèces, la région N-terminale des PLD présente un ou plusieurs domaines régulateurs, capables d'interagir avec la membrane. En effet, ces domaines permettent généralement de réguler le recrutement des PLDs à la membrane, tels que le domaine PX (domaine d'homologie à phox) (Xu *et al.*, 2001) et le domaine PH (domaine d'homologie à la pleckstrine) (Lemmon, 2007), capables d'interagir avec les phosphoinositides (Figure 23A et B). On retrouve également le domaine C2 (Cf. 1.6), capable de se transloquer à la membrane de manière Ca²⁺-dépendante (Figure 23C) (Wang, 2000), ou encore l'hélice transmembranaire des PLDs 3-6 humaines, qui permet leur ancrage à la membrane du RE ou à la membrane externe de la mitochondrie (Frohman, 2015).

Ainsi, les PLDs de levures, les PLDs -1 et -2 de mammifères et les PLDs - ζ 1 et - ζ 2 de plantes (voir Figure 21) présentent un domaine ressemblant significativement au domaine PX (Ponting *et al.*, 1996) ainsi qu'un domaine contenant une séquence consensus des domaines PH (Steed *et al.*, 1998). Le domaine PX (Figure 23A), présent dans de nombreuses protéines de signalisation, est décrit comme étant impliqué dans une grande variété d'interactions protéine-protéine et protéine-membrane, notamment *via* son interaction avec le PIP₂ (Stahelin *et al.*, 2004). Le domaine PH (Figure 23B), quant à lui, contient une centaine de résidus et est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal (Gibson *et al.*, 1994).

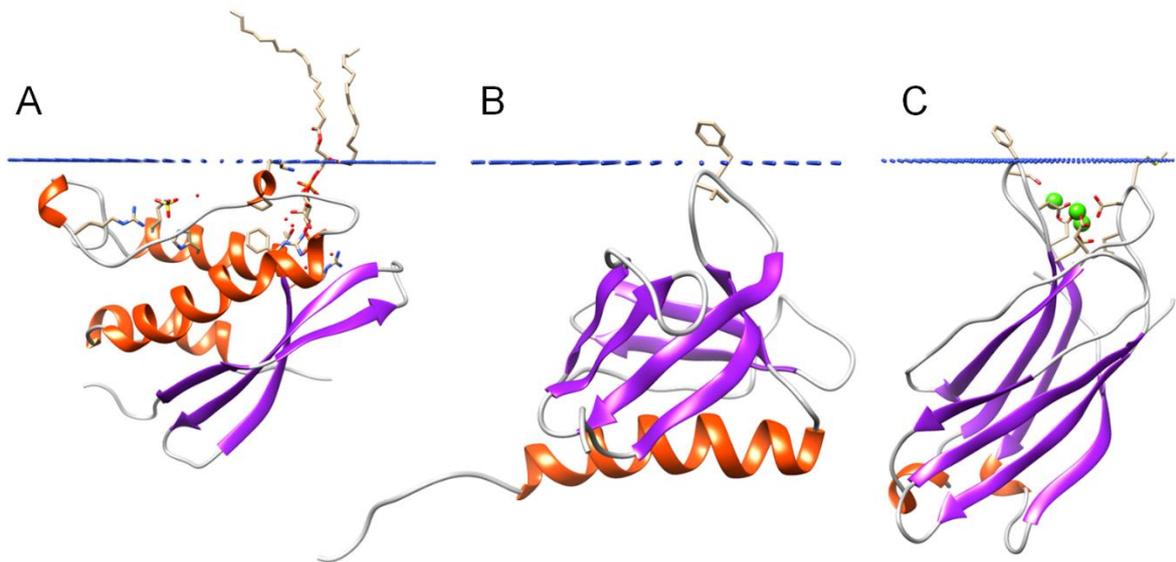


Figure 23 : (A) Structure du domaine PX de la NADH oxydase (p47phox) fixant le PIP₂ (PDB : 1O7K). (B) Structure du domaine PH de la pleckstrine (PDB : 1PLS). (C) Structure du domaine C2A de la Synaptotagmin-1 (PDB : 1BYN) en présence des ions calcium (colorés en vert).

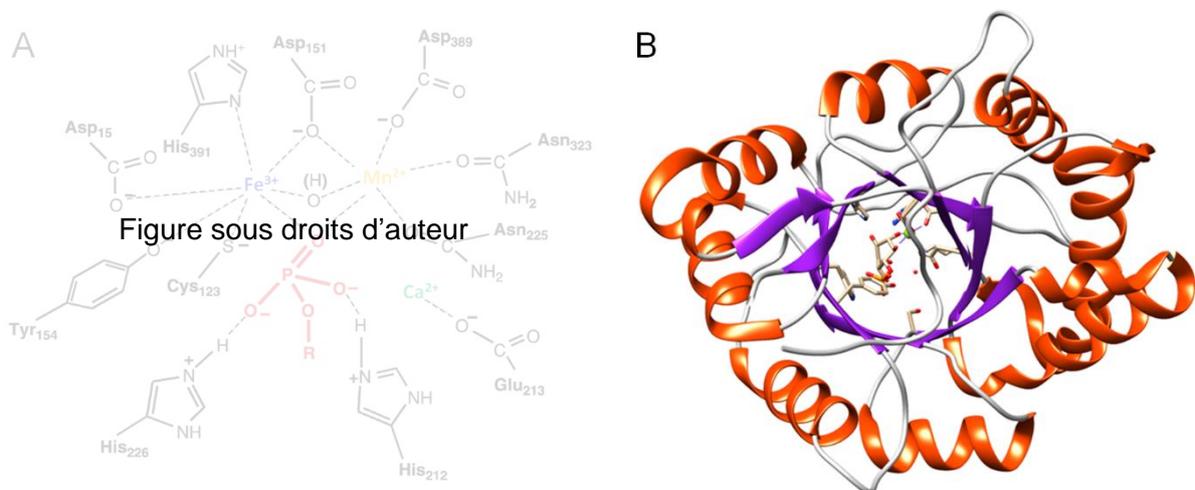
Par ailleurs, les domaines PH sont également impliqués dans l'interaction avec le PIP₂ et sont palmitoylés chez les PLDs humaines (Han *et al.*, 2002). On peut également observer la présence de certains domaines impliqués, quant à eux, dans d'autres fonctions biologiques. Ainsi, le domaine LOCO / phos (voir Figure 21) est une région hyperphosphorylée qui est impliquée dans la localisation cellulaire des PLDs de levures, en régulant leur translocation aux membranes endosomales durant la méiose (Rudge *et al.*, 2002). Le domaine P/Y (voir Figure 21), quant à lui, n'est présent que dans les PLDs de plantes de type β et n'a pas encore de fonction définie, bien qu'il puisse être impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines (Cf. 1.5.2).

1.4.2. Les PLDs dépourvues de séquence consensus HKD

À l'inverse des PLDs à séquence consensus HKD, les PLDs ne contenant pas de séquence consensus HKD ne présentent aucune homologie en acides aminés entre elles. Cette catégorie comporte ainsi plusieurs types de PLDs, provenant d'organismes eucaryotes et procaryotes, qui présentent des domaines catalytiques différents. Néanmoins, ces PLDs jouent des rôles biologiques tout aussi importants que les PLDs à séquence consensus HKD et plusieurs travaux ont permis leurs caractérisations biochimiques. Ainsi, chez les bactéries, les PLD « non HKD » sont généralement sécrétées et sont employées comme facteur de virulence, telles que les PLDs de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ou d'*Arcanobacterium haemolyticum* (Cuevas *et al.*, 1993), tandis que chez les mammifères, ces PLDs présentent des rôles précis, tels que l'hydrolyse des ancrs GPI ou encore la cyclisation du lyso-PA.

1.4.2.1. La PLD de *Streptomyces chromofuscus*

La PLD de *Streptomyces chromofuscus* (ScPLD, 57 kDa) est, quant à elle, sécrétée et présente des activités hydrolases et transphosphatidylases. Cette PLD est probablement la plus caractérisée parmi les PLD « non HKD » et serait impliquée dans le recyclage du phosphate extracellulaire. Pour être totalement active, la ScPLD nécessite des ions calcium pour lesquels, elle présente deux sites de fixation avec des affinités de 60 μM et de 2 mM (Zambonelli *et al.*, 2003). Par ailleurs, lorsque cette PLD est pure et concentrée, elle présente une couleur pourpre, similaire à celle de la phosphatase acide pourpre, qui est due à la présence d'ions fer dans son site actif. Néanmoins, la ScPLD nécessiterait, en plus du Ca^{2+} et du Fe^{3+} , la présence de Mn^{2+} dans son site actif, tel que décrit dans la figure 24A (Zambonelli *et al.*, 2003).



1.4.2.2. PLD de venin d'araignée

L'araignée recluse brune (*Loxosceles reclusa*) exprime dans son venin une sphingomyélinase D, dont l'action est similaire à la PLD. En effet, cette toxine est capable d'hydrolyser la SM afin de libérer une molécule de choline ainsi qu'une molécule de céramide-1-phosphate (Selvy *et al.*, 2011). Néanmoins, cette enzyme est classée dans la superfamille des PLD puisqu'elle est également dotée de cette activité, en hydrolysant le lyso-PC afin de générer du lyso-PA (Selvy *et al.*, 2011). Cette enzyme est un facteur de virulence puissant chez l'Homme (Norris *et al.*, 2014) et serait notamment responsable d'hémolyses, dues au céramide-1-phosphate, de thromboses, *via* l'agrégation plaquettaire causée par le lyso-PA, mais serait également responsable de nécroses dermiques ainsi que de la dérégulation du système immunitaire (Tambourgi *et al.*, 1998). C'est pourquoi, de

nombreux travaux de caractérisation de cette enzyme ont été entrepris, conduisant notamment à la résolution de sa structure 3D en 2015 (Figure 24B) (Coronado *et al.*, 2015). Ainsi, la structure 3D de la PLD de *Loxosceles reclusa* sous forme d'intermédiaire réactionnel avec le *myo*-inositol 1-phosphate a permis de démontrer l'existence d'un changement conformationnel lors de la fixation de son substrat sur des résidus aromatiques hautement conservés (Tyr 223 et Trp 225).

1.4.2.3. Autres PLDs humaines « non HKD »

Outre les PLDs à séquence consensus HKD décrites chez l'Homme, d'autres PLD non homologues ont été identifiées et clonées. On distingue notamment la glycosylphosphatidylinositol (GPI)-PLD (GPI-PLD) qui hydrolyse le GPI, un glycolipide responsable de l'ancrage de diverses protéines aux membranes cellulaires (Cf. 1.1.3.1). Son action permet ainsi de libérer l'ancre GPI de certaines protéines périphériques, en générant une molécule de PA (Paulick *et al.*, 2008).

La N-acyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE)-PLD (NAPE-PLD) hydrolyse, quant à elle, la NAPE, afin de générer une molécule de PA et de libérer de la N-acyléthanolamine. Cette PLD joue un rôle important dans la synthèse des endocannabinoïdes, la N-acyléthanolamine étant le précurseur de l'anandamide (Okamoto *et al.*, 2004). La résolution de sa structure 3D (Figure 25A) en 2015 a notamment permis de révéler son mécanisme de catalyse (Magotti *et al.*, 2015). En effet, pour être active, cette PLD nécessite deux atomes de zinc qui interagissent avec la NAPE ainsi qu'avec trois résidus His et un résidu Asp du site catalytique (Figure 25A).

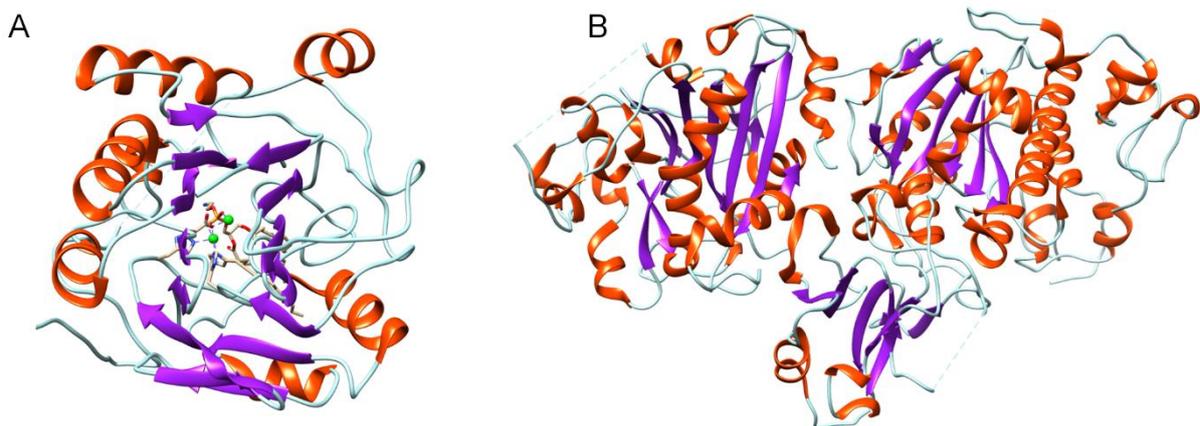


Figure 25 : (A) Structure 3D de la NAPE-PLD humaine (PDB : 4QN9) en présence de son substrat, le NAPE, ainsi que des deux atomes de zinc (coloriés en verts). (B) Structure 3D de l'ATX murine (PDB : 5L0B), utilisée pour la conception *in silico* d'inhibiteurs.

Enfin, l'autotaxine (ATX) est une lyso-PLD qui hydrolyse les lysophospholipides tels que la lysoPC afin de produire du lysoPA (Houben *et al.*, 2011). Sa structure 3D (Figure 25B) a pour la première fois été résolue en 2011 (Hausmann *et al.*, 2011) mais fait encore l'objet de nombreuses caractérisations structurales, notamment pour la conception d'inhibiteurs contre l'arthrite osseuse, la plus récente datant de 2016 (Jones *et al.*, 2016). Chez l'Homme, l'ATX est la principale source de LysoPA sérique (Tokumura *et al.*, 2002), bien qu'elle soit capable d'hydrolyser les nucléosides pyrophosphate. Par ailleurs, l'ATX est également capable de catalyser la réaction de transphosphatidylolation, afin de former du lysoPA cyclique en utilisant le groupement hydroxyle libre de la position *sn*-2 du lysophospholipide substrat (Fujiwara, 2008).

1.5. Les PLDs de plantes

1.5.1. Classification et rôles biologiques

Ce sont chez les plantes que l'on retrouve le plus grand nombre d'isoformes de PLD, toutes appartenant à la catégorie des PLDs à consensus « HKD ». En effet, jusqu'à présent, 12 gènes de PLD ont été clonés chez *Arabidopsis thaliana*, l'organisme modèle en génétique végétale (Li *et al.*, 2009, Wang, 2000), 5 chez *Lycopersicon esculentum* (tomate) (Laxalt *et al.*, 2001) et jusqu'à 17 gènes ont été identifiés chez *Oryza sativa* (riz) (McGee, 2003). Sur la base de leurs homologies de séquences, leurs architectures protéiques et leurs propriétés biochimiques, les PLDs d'*Arabidopsis thaliana* peuvent être regroupées en deux grandes catégories (Figure 26). Tout d'abord, la catégorie des C2-PLDs, qui comportent un domaine C2, ensuite la catégorie des PHPX-PLDs, qui contiennent, quant à elles, un domaine PX et un domaine PH, de manière similaire aux PLDs de mammifères.

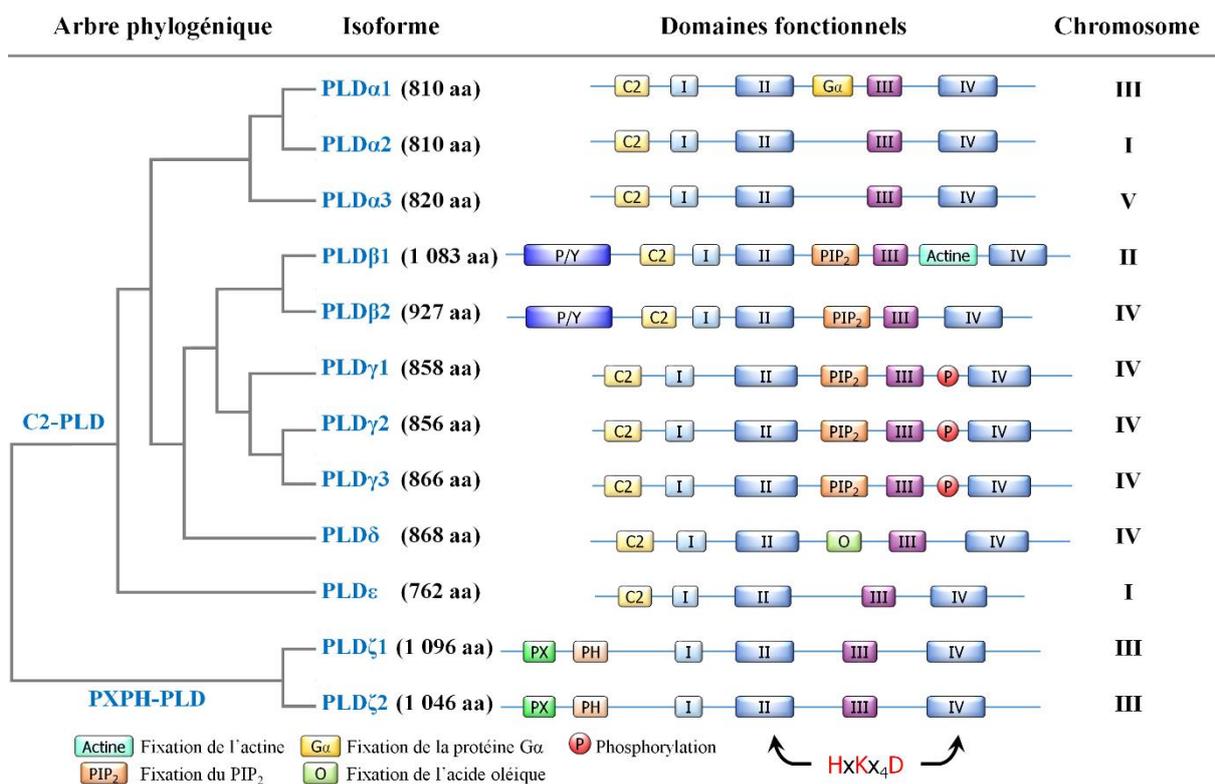


Figure 26 : Classification, localisation chromosomique et architecture des PLDs d'*Arabidopsis thaliana* (Qin *et al.*, 2002).

La catégorie des C2-PLDs est la plus représentée chez les plantes et comprend 10 gènes qui sont subdivisés en PLDs de types α (3 gènes), β (2 gènes), γ (3 gènes), δ et ϵ (Figure 26). *A contrario*, la catégorie des PHPX-PLDs ne présente que deux gènes qui codent les PLD- ζ 1 et - ζ 2 (Figure 26).

La PLD α constitue l'isoforme prédominante chez les plantes et peut être purifiée à homogénéité à partir de sources naturelles et/ou recombinantes (Cf. 1.5.3.1.). Le type α comprend 3 isoformes (Figure 26), classées en PLD- α 1, - α 2 et - α 3, qui sont impliquées dans divers processus physiologiques, tels que la résistance au stress hyper-osmotique ou la sénescence, vraisemblablement, par transduction des signaux de phytohormones. En effet, des travaux d'interférence ARN ont démontré que l'extinction de la PLD α 1 induit une diminution de la tolérance à la sécheresse (Mane *et al.*, 2007, Sang *et al.*, 2001b), une diminution de la guérison des blessures (Wang *et al.*, 2000), une augmentation de la longévité (Devaiah *et al.*, 2007) associée à une diminution de la sénescence (Fan *et al.*, 1997) ainsi qu'une meilleure tolérance au gel (Welti *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'inactivation de ce gène induit une diminution de la capacité d'ouverture et de fermeture des stomates (Mishra *et al.*, 2006) ainsi qu'une diminution de la croissance des racines sous stress salin (Bargmann *et al.*, 2009). Des travaux d'inactivation et de surexpression de la PLD α 3 ont, quant à eux, démontré que cette isoforme est impliquée dans la sensibilité à la sécheresse (Bargmann *et al.*, 2009) et au stress hyper-osmotique (Hong *et al.*, 2008). Enfin, la PLD α serait impliquée dans la production de ROS, tel que le peroxyde d'hydrogène (Sang *et al.*, 2001a).

Les PLDs de type β ont été les premières PLDs « non - α » décrites chez les plantes. Ces dernières sont plus rares que les PLD α , et n'ont jamais été purifiées à partir de sources naturelles. Les PLDs de type β , composées de 2 isoformes chez *Arabidopsis thaliana* (β 1 et β 2) (Figure 26), ont été démontrées comme étant impliquées dans la régulation de la polymérisation / dépolymérisation de l'actine et ont été proposées comme jouant un rôle important pour la croissance de la pointe des tubes polliniques (Pleskot *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces isoformes seraient également impliquées dans les mécanismes de défense contre les pathogènes bactériens et fongiques (Zhao *et al.*, 2013).

Le type γ est composé de 3 isoformes (γ 1, γ 2 et γ 3) (Figure 26) qui seraient, quant à elles, impliquées dans la modulation des lipides lors de stress à l'aluminium (Zhao *et al.*, 2011). Contrairement aux autres membres de la superfamille des PLDs d'*Arabidopsis*, les PLDs de type - δ et - ϵ sont les uniques représentantes de leur classe (Figure 26). Néanmoins, la PLD δ présente 2 variants d'épissage et serait impliquée dans l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène (Zhang *et al.*, 2003), la défense (Pinosa *et al.*, 2013), ainsi que, à l'instar du type α , dans la tolérance au gel (Li *et al.*, 2004) et au stress hyper-osmotique (Bargmann *et al.*, 2009). Par ailleurs, cette isoforme permet d'induire une réponse à la production de dérivés réactifs de l'oxygène et aurait ainsi un rôle complémentaire à la PLD α (Zhang *et al.*, 2003). La PLD ϵ (Figure 26), quant à elle, a initialement été regroupée

dans la sous-famille de type α (PLD α 4) et favoriserait la croissance des plantes, en agissant sur la signalisation de l'azote (Hong *et al.*, 2009).

Enfin, le type ζ est composé de deux isoformes (ζ 1 et ζ 2 aussi appelées P1 et P2) qui contiennent des domaines PX et PH, présentant ainsi une forte ressemblance aux PLDs humaines (Figure 26). La PLD ζ 1 serait impliquée dans la production de PA en cas de carence en phosphate (Li *et al.*, 2006) ainsi que dans la croissance des poils racinaires (Ohashi *et al.*, 2003). La PLD ζ 2, quant à elle, serait impliquée dans le gravitropisme racinaire (réaction des plantes à la gravité) induit par l'auxine (une phytohormone) (Li *et al.*, 2007) et jouerait un rôle dans le métabolisme des galactolipides en cas de pénurie de phosphate (Cruz-Ramirez *et al.*, 2006).

1.5.2. Fonctions et localisations cellulaires

De manière similaire aux PLDs de mammifères, les PLDs de plantes sont des acteurs notables de la signalisation cellulaire. Bien que le rôle précis de chaque isoforme n'ait pas encore été totalement élucidé, de nombreux laboratoires se sont employés à leur caractérisation. Il apparaît ainsi que le PA généré par la PLD aurait des rôles différents en fonction du type de PLD ainsi que de sa localisation cellulaire. En effet, plusieurs études de fractionnement cellulaire ainsi que de localisation par immuno-histochimie et par microscopie électronique ont permis de montrer que la PLD α se localiserait dans plusieurs compartiments cellulaires, tel que le cytosol, le RE, la mitochondrie ainsi que la vacuole (Fan *et al.*, 1999, Herman *et al.*, 1980, Xu *et al.*, 1996, Yuan *et al.*, 2006).

Par ailleurs, la PLD α serait principalement sous forme soluble dans la cellule, bien qu'une faible proportion soit associée aux membranes, telles que la membrane plasmique mais aussi les vésicules recouvertes de clathrine (Fan *et al.*, 1999). Ainsi, la PLD α présenterait différents rôles en fonction de sa localisation dans la cellule, tels que la transduction du signal au niveau de la membrane plasmique. En effet, Zhang et collègues (Zhang *et al.*, 2004) ont notamment démontré que la PLD α 1 était directement impliquée dans la signalisation de l'acide abscissique (ABA), une phytohormone intervenant dans les phénomènes de sénescence, de germination mais aussi dans la fermeture des stomates qui permet de lutte contre la sécheresse et le stress hyper-osmotique. Les auteurs sont notamment parvenus à démontrer que le PA généré par la PLD α 1 était en mesure d'interagir et d'inhiber ABI1 (ABA insensitive 1), une protéine phosphatase qui inhibe elle-même la signalisation cellulaire de l'ABA. Cette interaction permettrait ainsi de séquestrer ABI1 à la membrane plasmique afin de réduire sa translocation nucléaire et par conséquent, d'éviter son effet inhibiteur de la signalisation de l'ABA (Zhang *et al.*, 2004).

De plus, la PLD α 1 est capable d'interagir directement avec les sous-unités G α (Zhao *et al.*, 2004) et G β (Gookin *et al.*, 2014) des protéines G hétérotrimériques, elles-mêmes impliquées dans la signalisation de l'ABA. Ces interactions s'effectueraient *via* un motif EKF (Glutamyl, Lysyl, Phenylalanyl) analogue au motif DRY (Aspartyl, Arginyl, Tyrosyl), que l'on retrouve dans les récepteurs couplés aux protéines G chez les mammifères, et permettrait de moduler leurs activités enzymatiques. *In vitro*, cette interaction inhiberait l'activité hydrolytique de la PLD α mais activerait l'activité GTPasique de la sous-unité G α (Zhao *et al.*, 2004). Par ailleurs, le rôle de la PLD α dans la signalisation de l'ABA est également observé par l'activation de la sphingosine kinase, *via* le PA (Guo *et al.*, 2012b). Il est par ailleurs intéressant de noter que la sphingosine-1-phosphate est également capable d'activer la PLD α , ce qui permettrait une amplification du signal.

Au niveau du transport vésiculaire, la PLD α serait cette fois-ci associée au complexe d'adressage aux endosomes nécessaire pour le transport de type III (ESCRT - *endosomal sorting complex required for transport*) (Ibl *et al.*, 2012). Ce complexe permet de transporter certaines protéines vers différents compartiments cellulaires, tels que le milieu extracellulaire ou bien la vacuole, comme le montre la figure 30. La PLD α interagirait plus précisément avec la protéine VPS2 (*vacuolar protein sorting-associated protein 2*) et jouerait un rôle dans le bourgeonnement des vésicules *via* sa synthèse de PA (Cf. 1.2.2.5.).

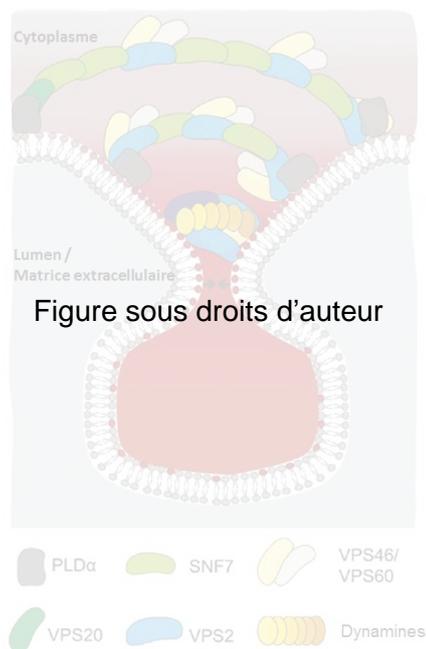


Figure 27 : Interaction de la PLD α avec le complexe ESCRT de type III, permettant de transporter certaines protéines vers différents compartiments cellulaires, tels que le milieu extracellulaire ou la vacuole.

Ce complexe est formé par différentes protéines spécialisées telles que SNF7 (*Vacuolar sorting protein 7*) ainsi que les VPS (*vacuolar protein sorting-associated protein*), et les dynamines. Les lipides colorés en rouge sur la membrane représentent le PA. D'après Ibl et collègues (2012) avec modifications.

L'implication de la PLD α dans le transport vésiculaire apparaît également importante dans d'autres systèmes de trafic vésiculaire, tel que le transport *via* les vésicules recouvertes de clathrine. En effet, outre les preuves directes de l'association de la PLD α avec ce type de vésicules (Fan *et al.*, 1999), plusieurs études ont démontré son interaction directe avec les différentes protéines de ce complexe. En effet, la PLD α interagirait directement avec l'adaptine AP-2 (Yamaoka *et al.*, 2013) (sous-unité du complexe adaptateur à la clathrine), mais aussi avec différentes syntaxines (Fujiwara *et al.*, 2014), appartenant à la famille SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*) et impliquées dans la fusion des membranes (voir Bonifacino et collègues (Bonifacino *et al.*, 2004) pour rappel sur les vésicules de transports cellulaires).

Enfin, au niveau de la vacuole, Simoes et collègues (Simoes *et al.*, 2005) ont précédemment rapporté une interaction entre la PLD α de *Cynara cardunculus* (CcPLD α) et la cardosine A, une aspartate protéinase qui s'accumule dans les vacuoles de stockage protéiques. Cette interaction spécifique se produit avec le domaine C2 par l'intermédiaire de motifs RGD / KGE, présents dans la cardosine A, et aboutit à une protéolyse du domaine C2 recombinant de la CcPLD α , lors de la dissociation du complexe (Simoes *et al.*, 2005).

Concernant les PLDs de type $-\beta$ et $-\gamma$, ces isoformes seraient principalement localisées au niveau des membranes plasmique et mitochondriale (Fan *et al.*, 1999). Par ailleurs, ces PLDs interagiraient notamment avec plusieurs isoformes des protéines 14-3-3, telles que l'isoforme ω qui se fixe au domaine P/Y de la PLD β (Chang *et al.*, 2009, Shin *et al.*, 2011). Les protéines 14-3-3 sont des protéines régulatrices qui se fixent notamment sur les protéines phosphorylées, suggérant que les PLD- β et $-\gamma$ sont également régulées par des phosphorylations. En effet, bien qu'une telle hypothèse n'ait jamais été formulée pour la PLD β , Jones et collègues (Jones *et al.*, 2014) sont parvenus à démontrer que la PLD γ interagit avec CPK15, une protéine kinase calcium dépendante. De surcroît, l'activité enzymatique de la PLD β est modulée par l'interaction avec l'actine (Pleskot *et al.*, 2010). En effet, cette isoforme présente un site de fixation à l'actine (Figure 26) et apparaît être inhibée par la forme globulaire, tandis que la forme polymérisée agirait comme un activateur.

La PLD δ , quant à elle, serait également retrouvée au niveau de la membrane plasmique. Cette isoforme est activée par la présence de dérivés réactifs de l'oxygène, produits *via* la PLD α , et transmet son signal *via* les glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogenases GAPC1 et GAPC2 (Guo *et al.*, 2012a). Concernant la PLD ϵ , celle-ci se localise au niveau des membranes cellulaires et interagirait avec une isoprenylcystéine α -carbonyl méthylésterase, qui agit dans la régulation positive de la signalisation de l'ABA (Jones *et al.*, 2014).

Concernant la PLD ζ 1, cette isoforme est une cible directe de GLABRA2 (Ohashi *et al.*, 2003), un élément clé du système de régulation cellulaire qui est composé des gènes et de facteurs de transcription qui régulent la croissance des poils racinaires. Ainsi, le PA généré par la PLD permettrait d'activer l'AtPDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase-1), impliquée dans la signalisation cellulaire des nucléotides mono-phosphate cycliques (Anthony *et al.*, 2004). Enfin, la PLD ζ 2, quant à elle, se localise principalement au tonoplaste, *via* son domaine N-terminal (Yamaryo *et al.*, 2008). Le PA généré par cette isoforme permet la formation de vésicules contenant le transporteur PIN-FORMED 2, responsable du transport et de la distribution d'auxine (Li *et al.*, 2007).

1.5.3. Purification et caractérisation de la PLD α

1.5.3.1. Méthode de purification

La raison pour laquelle les PLDs de plantes ont suscité un engouement important, provient du fait que, outre leurs taux élevés d'activité, ces PLDs peuvent être facilement purifiées à partir d'extraits protéiques de plantes. Ceci est particulièrement vrai pour le type α , qui est naturellement exprimé en grande quantité. En effet, en 1992, Lambrecht et Ulbrich-Hofmann (Lambrecht *et al.*, 1992) ont étudié l'interaction de la PLD α avec diverses résines de chromatographie hydrophobes et sont parvenus à mettre au point une méthode de purification optimale. Cette méthode se base sur l'interaction de la PLD α avec des groupements chimiques hydrophobes, tels que le bras octyle de l'Octyl-Sépharose, en présence d'une forte concentration de calcium (50 mM de Ca²⁺) et à pH relativement acide (pH 5-6). En effet, dans ces conditions, la PLD α se fixe sur la colonne de chromatographie, tandis que les protéines contaminantes ne sont pas retenues. Néanmoins, cette interaction est réversible par chélation des ions calcium, en présence d'EDTA (un agent chélateur), et permet d'éluer la PLD de la colonne. Bien que d'autres méthodes puissent être utilisées, telles que la précipitation différentielle ou encore les chromatographies d'exclusion stérique et/ou d'échangeuse d'ions, cette méthode est la plus utilisée, du fait de sa simplicité et de son efficacité.

1.5.3.2. Activité enzymatique et spécificité de substrat

In vitro, les PLDs de type α , purifiées à partir de diverses sources végétales ont été démontrées comme étant capables d'hydrolyser la PC, la PE ainsi que le PG en présence de 20 à 100 mM de Ca²⁺ et de détergents, à un pH physiologique (Abdelkafi *et al.*, 2011b, Dippe *et al.*, 2009a, Ella *et al.*, 1997, Moreno-Perez *et al.*, 2010, Pappan *et al.*, 1998). Cependant, une telle valeur de concentration de Ca²⁺ n'est retrouvée que dans la vacuole, qui présente

une concentration totale de Ca^{2+} d'environ 80 mM et une concentration de Ca^{2+} libre d'environ 5 mM (Stael *et al.*, 2012). *A contrario*, les autres compartiments cellulaires présentent des concentrations de Ca^{2+} libre de l'ordre du μM , à l'image du cytoplasme qui présente une concentration d'environ 0,1 μM de Ca^{2+} libre ou du RE qui présente une concentration de Ca^{2+} libre d'environ 500 μM (Stael *et al.*, 2012).

Néanmoins, en utilisant la PLD α recombinante de *Ricinus communis* (RcPLD α), Pappan et Wang (Pappan *et al.*, 1999) ont également montré qu'à un pH de 5, les PLDs de type α présentent, en l'absence de Ca^{2+} , une activité hydrolytique basale sur des vésicules de PC, contenant majoritairement de la PE ainsi que du PIP_2 , mais qui est stimulée par des concentrations de Ca^{2+} allant de 10 μM à 1 mM (Pappan *et al.*, 1999). Cependant, chez *Arabidopsis thaliana*, un tel pH n'est retrouvé que dans la vacuole (pH 5,2) (Shen *et al.*, 2013), tandis que les autres compartiments cellulaires, comme le cytoplasme, le RE, l'appareil de Golgi et le noyau, présentent un pH neutre (pH voisin de 7) ou légèrement alcalin, pour la mitochondrie et le peroxysome (pH 8,1 à 8,4) (Shen *et al.*, 2013).

Par conséquent, les valeurs optimales de pH et de concentration de Ca^{2+} observées pour la régulation des PLDs de type α apparaissent en contradiction avec les valeurs observées pour les différents compartiments cellulaires. Ainsi, ces différences de régulation pourraient s'expliquer par les propriétés biochimiques de leur domaine C2, supposé être régulateur de leur activité en présence de Ca^{2+} . En effet, comme le montre la figure 26, la région N-terminale des PLDs de type α est homologue au domaine C2, impliqué dans les interactions protéine / membrane de manière Ca^{2+} -dépendante. Ainsi, la question de l'implication du domaine C2 dans la régulation des PLDs de type α peut être posée.

1.5.3.3. Glycosylation de la PLD α

Les travaux de purification de la PLD α de *Vigna unguiculata* (VuPLD α) recombinante chez *Pichia pastoris* et en cellules d'insecte ont également mis en évidence la présence de glycosylations, les PLD α présentant, par ailleurs, des sites potentiels de N-glycosylations dans leur séquence primaire. De plus, ce phénomène a également été montré pour la PLD α de *Glycine max* (GmPLD α) (Abousalham *et al.*, 1995), purifiée à partir de cellules de soja en suspension, qui réagit fortement avec des anticorps dirigés contre les N-glycosylations de type complexe ainsi que certaines lectines (concanavoline A et *Lens culinaris* agglutinine). Par ailleurs, ces glycosylations sont également présentes dans les PLD α de *Brassica oleracea* (BoPLD α) et d'*Helianthus annuus* (HaPLD α), purifiées à partir de sources naturelles, qui peuvent être détectées par plusieurs lectines ainsi que par des anticorps anti- $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucose (Abousalham, données non publiées). Chez les plantes, ce type de liaison est retrouvé dans les N-glycosylations de type complexe et de type

paucimannosidique, ajoutées dans l'appareil de Golgi sur les résidus asparagyl des protéines destinées à la vacuole ou au milieu extracellulaire (Rayon *et al.*, 1998). Ces résultats apparaissent pour le moins étonnants puisque les PLDs de type α ne présentent pas de séquence connue pour l'adressage au système endomembranaire dans leurs séquences primaires. Néanmoins, ces données sont en accord avec les résultats de localisations cellulaires (Cf. 1.5.2), qui indiquent que les PLD α sont présentes dans le RE ainsi que la vacuole, et qui suggère ainsi l'existence d'un mécanisme non encore élucidé.

1.5.3.4. Structure de la PLD α

La possibilité de purifier la PLD α en grande quantité a, par ailleurs, offert la possibilité d'effectuer des études structurales dans le but de déterminer la structure 3D des PLDs à consensus « HKD » d'origine eucaryote. En effet, bien que la structure de la PLD de *Streptomyces* sp. souche PMF ait été résolue, cette dernière ne présente pas tous les domaines conservés présents dans les PLD eucaryotes (Cf. Figure 21). De plus, la détermination de la structure 3D des PLDs de plantes permettrait également la modélisation de la structure des PLDs humaines, celles-ci n'étant que très difficilement exprimées de manière recombinante, notamment dans le but de développer/optimiser des inhibiteurs spécifiques.

Ainsi, en 2001, Abergel et collègues (Abergel *et al.*, 2001) sont parvenus à obtenir des cristaux de la VuPLD α diffractant à une résolution de 1.94 Å. Cependant, aucun dérivé d'atomes lourds n'a pu être obtenu afin de déterminer l'information de phase et la structure 3D de cette PLD n'a, par conséquent, pu être résolue. Les travaux ultérieurs de Stumpe et collègues (Stumpe *et al.*, 2007) ont, néanmoins, permis de modéliser la structure 3D de la BoPLD α 2 en solution, par diffusion de rayons X aux petits angles (Figure 28). Bien que ce modèle structural soit de faible résolution, il permet cependant de mettre en évidence la présence de trois domaines distincts (Figure 28). Ces domaines n'ont pas pu être identifiés avec précision mais correspondraient au domaine C2 (à l'extrémité N-terminale), au domaine catalytique (comprenant les quatre régions conservées) ainsi qu'au domaine C-terminal, qui présenterait également un repliement autonome (Figure 28).

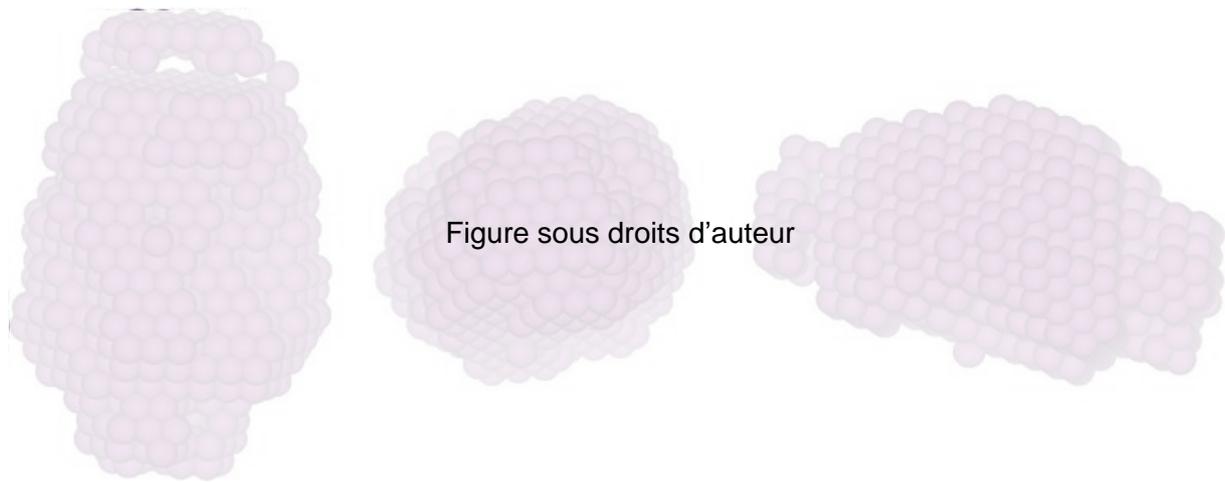


Figure 28 : Modèles de basse résolution de la structure 3D de la BoPLD α 2 obtenus à partir des données de diffusion de rayons X aux petits angles. Les modèles sont présentés dans trois vues différentes obtenues par rotation de 90° autour de l'axe y (milieu) et de l'axe z (à droite). D'après (Stumpe *et al.*, 2007). Les sphères représentent les atomes factices utilisés dans la procédure de recuit simulé, lors du processus de modélisation.

1.5.4. Expression recombinante des autres types de PLD d'*Arabidopsis*

Bien que la majorité des travaux de caractérisation biochimiques concernent les PLDs de type α , plusieurs études rapportent également l'expression de manière recombinante des autres types de PLDs d'*Arabidopsis thaliana*. Ces travaux ont tous été réalisés par le laboratoire du Pr. X. Wang et concernent les PLD $-\beta$ 1 (Zheng *et al.*, 2002), $-\gamma$ 1 (Qin *et al.*, 1997) et $-\gamma$ 2 (Qin *et al.*, 2006), $-\delta$ (Wang *et al.*, 2001), $-\varepsilon$ (Hong *et al.*, 2009) et $-\zeta$ 1 (Qin *et al.*, 2002). Ainsi, à l'instar de la PLD α , la PLD β est capable d'hydrolyser la PC, la PE et le PG mais aussi la PS et ce, en présence de cofacteurs lipidiques tels que le PIP $_2$ (Wang, 2000). Par ailleurs, cette enzyme est activée *in vitro* en présence de concentrations de Ca $^{2+}$ de l'ordre de la micromolaire (100 μ M) (Wang, 2000). Il est cependant important de noter que ces études ont été réalisées en l'absence du domaine P/Y, ce domaine n'étant que partiellement identifié lors du premier clonage de la PLD β .

De manière similaire à la PLD de type β , le type γ n'est pas actif sur la PC, la PE ou le PG sous forme de micelles mixtes. Néanmoins, en présence de PIP $_2$, la PLD γ est capable d'hydrolyser la PE et la PS, sous forme de liposomes. De plus, lorsque le PIP $_2$ et la PE sont inclus dans les liposomes substrats, la PLD γ est active sur la PC, le PG ainsi que sur le NAPE et ce, en présence de 50 μ M de Ca $^{2+}$, à un pH physiologique (Qin *et al.*, 2006, Qin *et al.*, 1997). De même que pour les PLDs de type β et de type γ , le type δ est capable d'hydrolyser la PC en présence de PIP $_2$ et de 50 μ M de Ca $^{2+}$, mais apparaît également être stimulé par l'oléate (Wang *et al.*, 2001). De manière intéressante, parmi toutes les PLD, la

PLD ϵ est la plus permissive en termes d'activité enzymatique. En effet, cette PLD peut être dosée en présence de détergents et de Ca²⁺ pour des concentrations de l'ordre du mM, mais aussi de l'ordre du μ M, en présence d'oléate et de PIP₂ (Hong *et al.*, 2009). Enfin, la PLD ζ 1 hydrolyse préférentiellement la PC mais est aussi active sur la PE et la PS à pH 7 (Qin *et al.*, 2002). À l'instar des PLD humaines, cette isoforme possède des domaines PX ainsi que PH (Cf. Figure 26), et apparaît être activée par le PIP₂, de manière Ca²⁺-indépendante.

1.6. Les domaines C2 des PLDs de plantes

1.6.1. Le domaine C2

Le domaine C2, ou CaLB « *Calcium/lipid-binding domain* » (Cf. Figure 26), est un module d'environ 130 résidus qui est commun à de nombreuses protéines membranaires eucaryotes et procaryotes. Le domaine C2 a été identifié, pour la première fois, comme le second des quatre domaines conservés des PKC calcium-dépendantes. Il possède la particularité de s'adsorber aux membranes en présence de cations divalents (Figure 29), tels que les ions calcium, et de cofacteurs lipidiques (Nalefski *et al.*, 1996, Nishizuka, 1988).

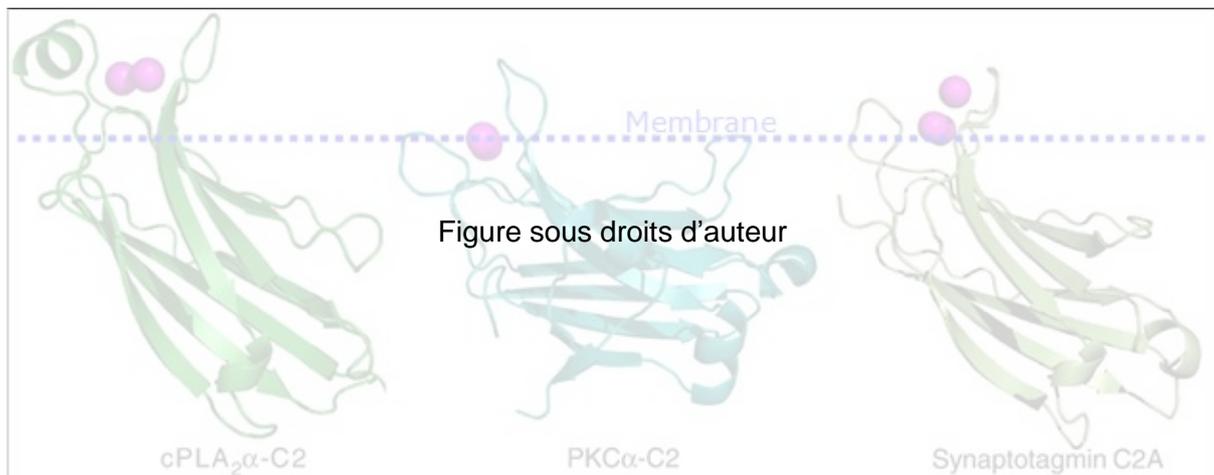


Figure 29 : Structures 3D des domaines C2 de la cPLA₂ (cPLA₂-C2), de la PKC α (PKC α -C2) et de la synaptotagmine (C2A) interagissant avec la membrane (en pointillé) en présence de Ca²⁺ (représenté par des sphères roses) (Cho *et al.*, 2006).

Outre les PLD de plantes, ce domaine est conservé dans plusieurs protéines impliquées dans la transduction du signal. On le retrouve notamment dans les protéines associées au transport vésiculaire, telles que la synaptotagmine (Chapman *et al.*, 1994), au catabolisme des lipides, comme la cPLA₂ (Stahelin *et al.*, 2003) ou encore à la phosphorylation des protéines, telles que la PKC (Nalefski *et al.*, 1996) (Figure 29).

Par ailleurs, le domaine C2 est aussi présent dans certaines toxines, à l'instar de l' α -toxine de *Clostridium perfringens* (Guillouard *et al.*, 1997). Ainsi, la cristallisation du domaine C2 de la synaptotagmine I (SytIA) (Sutton *et al.*, 1995) a révélé une structure en sandwich β composée de huit brins β , formant deux feuilletts antiparallèles (Figure 30). Cette structure est, par ailleurs, caractérisée par trois régions impliquées dans la fixation du Ca^{2+} , appelées CBRs pour « calcium binding regions » (Nalefski *et al.*, 1996) (Figure 30).

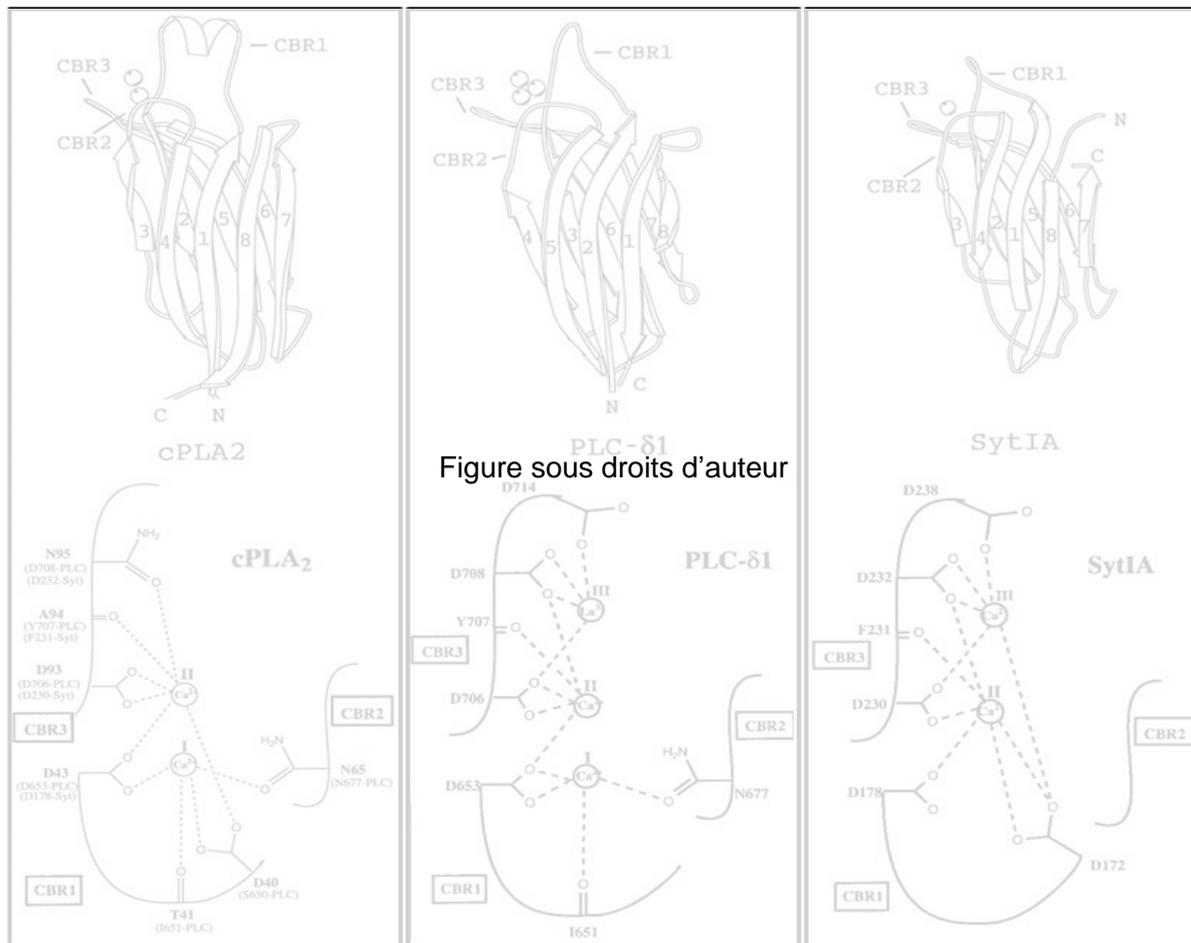


Figure 30 : Modèles de repliements des domaines C2 de la cPLA₂, de la PLC δ 1 et de la SytIA et représentations schématiques de leurs régions de liaison au calcium. Les modèles sont représentés selon le mode « ribbon » ; les brins β sont annotés de 1 à 8 ; les atomes de calcium sont représentés en mode compact ou « CPK » et les régions de liaison aux ions calcium sont annotées de CBR1 à CBR3 (Perisic *et al.*, 1998).

Par la suite, la résolution de la structure du domaine C2 de la PLC δ 1 spécifique des phosphoinositides (PI-PLC δ 1) (Essen *et al.*, 1996), puis de la cPLA₂ a permis de mettre en évidence l'existence de deux types de topologies nommés topologie I et topologie II (Figure 31). En effet, comme le montre la figure 31, la topologie I est basée sur la structure du domaine C2 de la SytIA tandis que la topologie II est basée sur celle du domaine C2 de la PI-PLC δ 1. La principale différence entre ces deux topologies réside en la connexion et l'orientation des brins β (Nalefski *et al.*, 1996).

Néanmoins, la détermination de la structure 3D de la lipase pancréatique humaine (HPL) (Winkler *et al.*, 1990) a révélé l'existence d'une troisième topologie (topologie III) qui diffère des deux topologies précédentes par une interconversion de ses brins $\beta 6$ et $\beta 8$ (Figure 31). Ainsi, ce domaine, nommé domaine PLAT (*Polycystin-1, lipoxxygenase and Alpha Toxin*), par homologie avec la polycystin-1 (Bateman *et al.*, 1999) serait en réalité un domaine « C2-like » (Chahinian *et al.*, 2000). En effet, le domaine C-terminal de la HPL présente une homologie structurale avec les domaines C2, bien qu'il possède une boucle hydrophobe additionnelle, la boucle $\beta 5'$ (Figure 31, topologie III), située entre les brins $\beta 5$ et $\beta 6$ et qui joue un rôle important dans l'adsorption de l'enzyme à l'interface des membranes (Chahinian *et al.*, 2000).

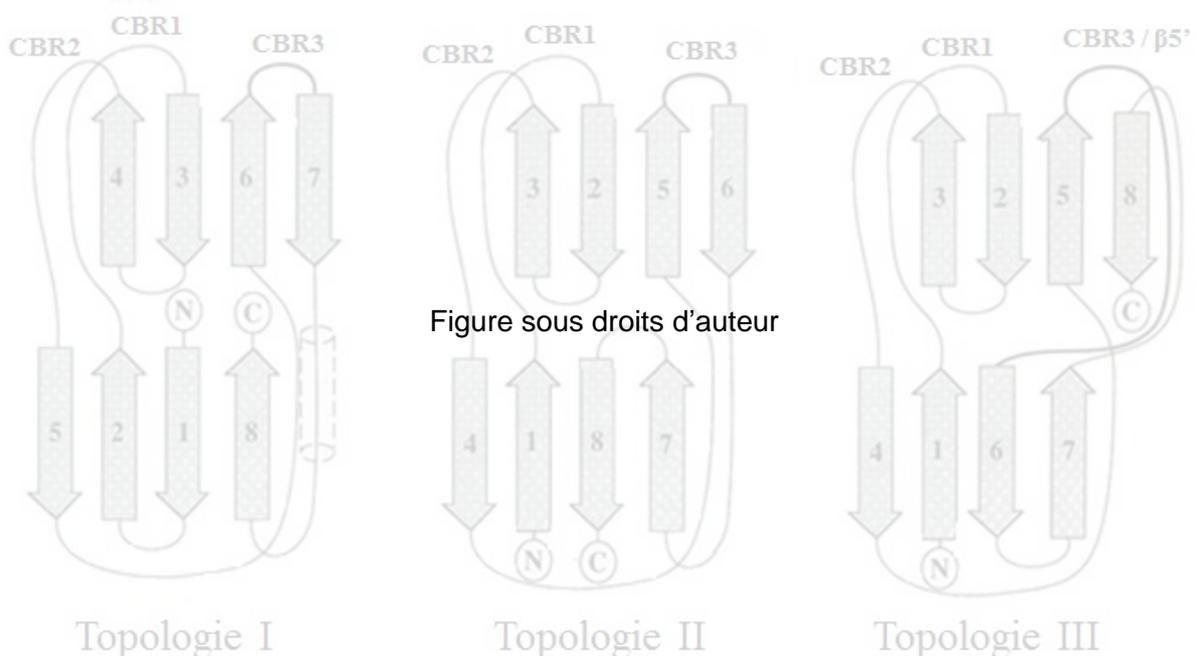


Figure 31 : Représentation schématique des topologies présentées par les domaines C2. Les topologies sont basées sur les structures des domaines C2 de la SytIA (topologie I), de la PI-PLC- $\delta 1$ (topologie II) et de la HPL (topologie III). Une hélice α est présente entre les brins $\beta 7$ et $\beta 8$ du domaine C2 de la rabphiline (topologie I - pointillés) et le domaine C2 de la HPL (topologie III) possède une boucle hydrophobe ($\beta 5'$). D'après Chahinian *et al.* (2000).

Par ailleurs, les domaines C2 peuvent également présenter une ou plusieurs hélices α . On retrouve notamment cette structure secondaire entre les brins $\beta 7$ et $\beta 8$ du domaine C2 de la rabphiline (Figure 31, topologie I) (Chahinian *et al.*, 2000) ou encore, entre les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ du CBR1 de la cPLA₂ (Figure 29 et Figure 30). Chez ce dernier, l'hélice α serait stabilisée par les ions calcium et induirait une rigidification du CBR1 (Perisic *et al.*, 1998).

1.6.2. Interactions avec le calcium et les membranes

L'importante affinité des domaines C2 pour le Ca^{2+} s'explique par la présence de résidus aspartyles, au niveau des CBRs, dont les chaînes latérales permettent, *via* leur groupement carboxylate, de chélater les cations divalents (Figure 30). On observe, de surcroît, une participation importante d'autres résidus tels que les résidus glutamyls, les résidus asparagyls ainsi que certains groupements carbonyles des liaisons amides du squelette peptidique (Figure 30). Enfin, bien que le dogme généraliste implique une fixation spécifique de Ca^{2+} par les domaines C2, on observe parfois une certaine affinité pour d'autres cations divalents. C'est notamment le cas de la PKC ϵ calcium-indépendante, dont le domaine C2 est capable de fixer les ions magnésium (Ochoa *et al.*, 2001).

Ainsi, grâce à leur structure et à la présence des CBRs, les domaines C2 sont capables de se fixer aux membranes de manière Ca^{2+} -dépendante, leur permettant de réguler le recrutement des protéines aux membranes. De manière intéressante, des études de fixation du Ca^{2+} par la cPLA₂ (Cf. Figure 30) et la PKC α (Figure 32), par rapport à leurs domaines C2 seuls respectifs, ont montré un effet différent de chaque Ca^{2+} sur le comportement de ces protéines (Stahelin *et al.*, 2001). En effet, des études de mutagenèse dirigée sur les résidus de fixation du Ca^{2+} , alliées à des études de résonance plasmonique de surface et de pénétration à l'interface de monocouches lipidiques, ont révélé que la fixation du Ca^{2+} au CBR3 conduit à un changement conformationnel des domaines C2, critique pour leur pénétration à la membrane (Stahelin *et al.*, 2001).

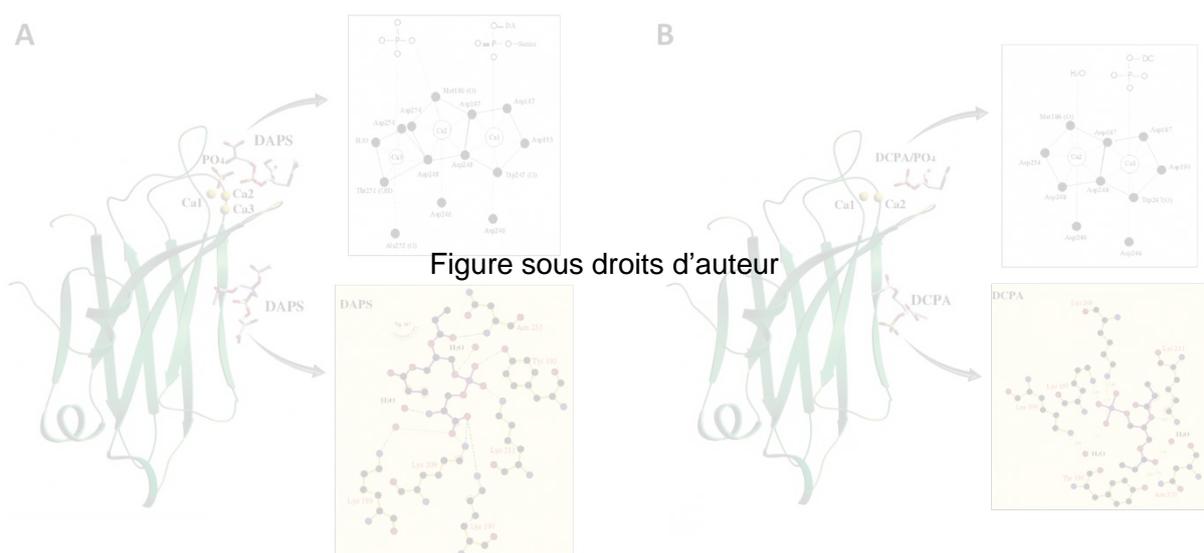


Figure 32 : Structure cristallographique du domaine C2 de la PKC α montrant les sites de fixation aux phospholipides de manière Ca^{2+} -dépendante et Ca^{2+} -indépendante. DAPS : diacetyl-PS et DCPA : dicaproyl-PA. (D'après Ochoa *et al.* (2002), avec modifications)

En revanche, la fixation du Ca^{2+} aux CBRs 1 et 2 s'est révélée être impliquée dans des comportements plus complexes, impliquant les enzymes entières et conduisant ainsi à une fixation indirecte à la membrane. Cet effet est notamment illustré par le changement du potentiel électrostatique induit par la fixation du Ca^{2+} au CBR1 de la PKC α , qui aboutit à une interaction avec la PS beaucoup plus prononcée pour l'enzyme que pour son domaine C2 seul (Stahelin *et al.*, 2001). Ainsi, la PKC α serait capable de se fixer à la PS mais également au PA de manière Ca^{2+} -dépendante, *via* son CBR1, tel qu'illustré dans la figure 32 (Figure 32, Ca1). Cependant, Ochoa et collègues ont également démontré que l'interaction de la PKC α avec les membranes peut s'effectuer de manière Ca^{2+} -indépendante, *via* une autre région de son domaine C2. En effet, cette région, composée de résidus basiques, est capable de fixer les phospholipides anioniques, tels que la PS, le PA et le PIP₂, comme le démontre la structure cristallographique du domaine C2 de la PKC α (Figure 32) (Ochoa *et al.*, 2002).

1.6.3. Les domaines C2 chez les PLDs de plantes

Comme précédemment présenté (Cf. Figure 26), la région N-terminale des PLDs de plantes, à l'exception du type ζ , est homologue au domaine C2. Ainsi, la présence de ce domaine permettrait d'expliquer le caractère Ca^{2+} -dépendant de ces PLDs pour la catalyse. En effet, à l'instar des domaines C2 présentés précédemment, les C2 domaines des PLDs de plantes présentent plusieurs résidus acides, qui leur permettent de former les CBRs (Figure 33). Néanmoins, ces domaines C2 présentent également une insertion d'une vingtaine de résidus, entre leurs brins $\beta 1$ et $\beta 2$, qui est une caractéristique unique parmi les domaines C2, bien que son rôle reste encore à déterminer (Figure 33).

Par ailleurs, de manière intéressante, le domaine C2 de la PLD α (C2 α) présente une substitution de deux résidus aspartyls, au niveau de ses CBRs 1 et 3 (Figure 33), tandis que les autres domaines C2 de plantes, tels que le domaine C2 de la PLD β (C2 β), présentent des CBRs complet (Figure 33). Par conséquent, ces disparités de séquences permettraient d'expliquer les différences de régulation par le Ca^{2+} , observées entre les PLD α et $-\beta$. Ainsi, Zheng et collègues (Zheng *et al.*, 2000) ont été en mesure de mettre en évidence l'existence de 1 à 3 sites de liaison au Ca^{2+} , pour le domaine C2 de la PLD α d'*Arabidopsis thaliana*, qui présentent de(s) k_d allant de 470 à 590 μM . À l'inverse, il n'a pas été possible aux auteurs d'en faire autant pour le domaine C2 β , la boucle supplémentaire étant responsable de sa précipitation, lors de son expression de manière recombinante chez *E. coli*. Ainsi, les auteurs ont choisi de supprimer cette boucle (Figure 33), aboutissant alors au domaine C2 $\beta^{\Delta 173-190}$, qui présente 3 sites de liaison au Ca^{2+} avec des affinités différentes ($k_{d1} = 0,8 \mu\text{M}$, $k_{d2} = k_{d3} = 24 \mu\text{M}$) (Zheng *et al.*, 2000).

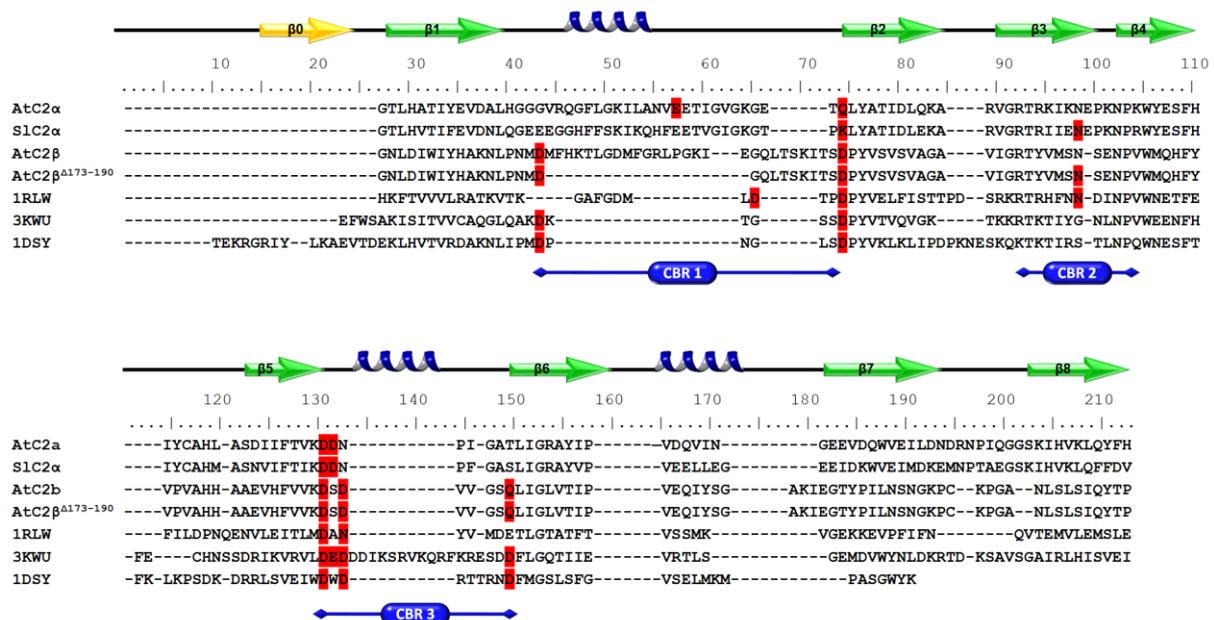


Figure 33 : Alignement des séquences en acides aminés des domaines C2α et C2β d'*Arabidopsis thaliana* (AtC2α et AtC2β) ainsi que du domaine C2α de tomate (*Solanum lycopersicum* - SlC2α) avec les domaines C2 de la cPLA₂ (code PDB : 1RLW), de Munc13 (code PDB : 3KWU) et de la PKCα (code PDB : 1DSY). Les résidus surlignés en rouge représentent les résidus fixant le Ca²⁺, extraits des structures 3D. Le brin β₀, coloré en jaune, correspond au premier brin β présent dans la typologie I. Le domaine AtC2β^{Δ173-190}, correspond au domaine AtC2β modifié par Zheng *et al.* (2000).

Toutefois, une étude plus récente effectuée sur le domaine C2 de PLDα de tomate (*Solanum lycopersicum* - SlC2α) tend à contredire les résultats obtenus par Zheng et collègues. En effet, Tiwari et collègues (Tiwari *et al.*, 2011) sont parvenus à démontrer l'existence de deux sites de liaison de haute affinité pour le Ca²⁺ ($k_{d1} = k_{d2} = 60 \mu\text{M}$), malgré les substitutions observées. Par ailleurs, ce domaine C2α serait en mesure d'interagir avec les phospholipides de manière Ca²⁺-indépendante (Tiwari *et al.*, 2011), suggérant ainsi que la seule participation du domaine C2 n'est pas suffisante pour expliquer la régulation des PLDs de plantes.

1.7. Mécanismes de catalyse et d'inhibition des PLDs

1.7.1. La catalyse hétérogène

La PLD est enzyme lipolytique qui agit essentiellement à l'interface d'une phase aqueuse et d'une phase lipidique insoluble dans l'eau. Cette catalyse hétérogène s'effectuant à une interface, le modèle de Michaelis-Menten, utilisé en enzymologie homogène, ne peut donc pas être utilisé. Ainsi, afin de rendre compte des propriétés particulières des enzymes lipolytiques, un premier modèle, adapté du modèle Michaelien, fut proposé en 1973 par Verger et de Haas (Verger *et al.*, 1973) et peut-être décrit en deux étapes successives (Figure 34).

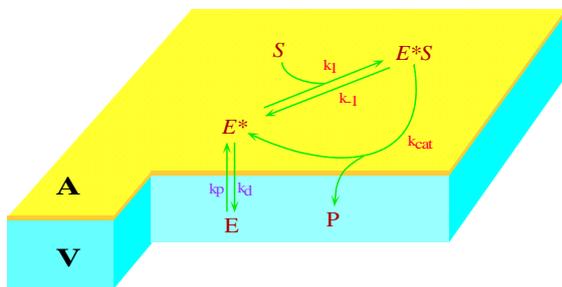


Figure 34 : Modèle de catalyse hétérogène des phospholipases d'après Verger *et al.* (1973). E : enzyme ; E* : enzyme à l'interface eau/lipides ; S : substrat ; P : produit ; k_p et k_d sont les constantes de vitesses ; k_{cat} étant la constante catalytique ; A étant la surface et V le Volume

L'enzyme (E) doit, de prime abord, changer de conformation (E*) afin de se transloquer à l'interface lipidique. Cette réaction partielle est régie par deux constantes de vitesse k_p et k_d qui représentent l'adsorption / pénétration (k_p) de l'enzyme à l'interface ainsi que sa désorption (k_d), le rapport k_d/k_p formant la constante de dissociation K_S .

Cette étape est suivie par la catalyse à proprement parler, qui est analogue à une réaction Michaelienne, se déroulant à l'interface et non pas en solution. Ainsi, durant cette réaction pseudo-Michaelienne, le substrat (S) est pris en charge par le site catalytique de l'enzyme afin de former un complexe ES qui permet d'aboutir rapidement à la formation du produit de réaction. De manière similaire au modèle de Michaelis-Menten, les cinétiques de catalyse sont régies par la constante catalytique, k_{cat} .

1.7.2. Cinétique interfaciale de la PLD

Deux autres modèles complémentaires ont été développés pour les cinétiques d'hydrolyse des phospholipides par la PLA₂ (Jain *et al.*, 1989) puis adaptés pour les PLDs à consensus « HKD » et non « HKD » (Selvy *et al.*, 2011). Ce dernier modèle est divisé en deux modes distincts, dont l'occurrence dépend de la force de la liaison entre l'enzyme et le substrat, celle-ci étant elle-même dépendante du type de PLD ainsi que de la nature de la tête polaire du phospholipide substrat.

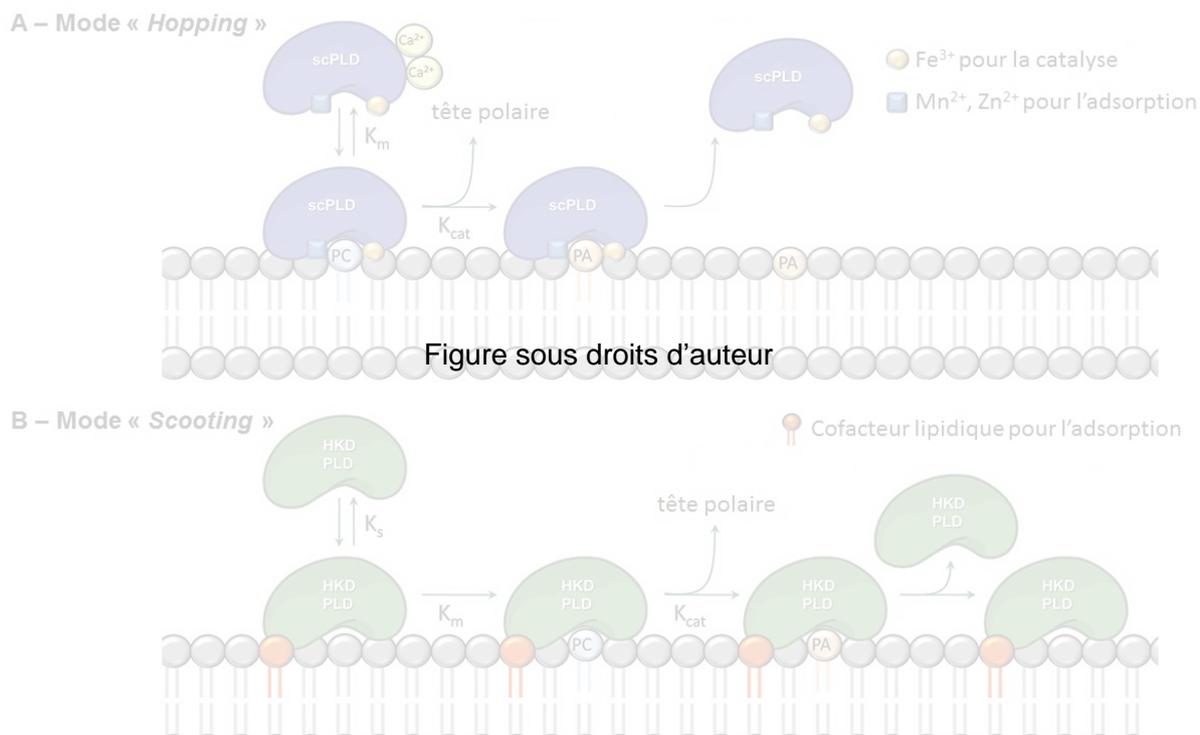


Figure 35 : Interaction membranaire des PLD, selon le mode « Hopping » (A) et « scooting » (B) (D'après Selvy *et al.* (2011) avec modifications).

Le 1^{er} mode ou *hopping mode* (Figure 35A) permet de décrire le mécanisme catalytique des PLDs « non-HKD ». Dans ce mode, l'enzyme s'adsorbe et se désorbe entre chaque cycle catalytique. Ainsi, une nouvelle étape d'adsorption sera nécessaire pour l'accomplissement d'une nouvelle action catalytique, induisant une faible efficacité de catalyse. Dans ce cas de figure, la constante de dissociation est très inférieure au k_{cat} .

Le 2nd mode ou *scooting mode* (Figure 35B) concerne les PLD à motif HKD et correspond au modèle de Verger *et al.* (Verger *et al.*, 1973) . Dans ce mode, l'enzyme s'adsorbe à l'interface et y demeure jusqu'à l'hydrolyse totale du film lipidique. L'enzyme va donc effectuer un nombre important de cycles d'hydrolyse et aura une efficacité catalytique importante. Ainsi, la constante de dissociation K_s est très supérieure au k_{cat} . Cependant, ce second mode ne prend pas en compte l'effet de l'activation de la PLD par son propre produit, le PA. Cet effet est notamment observable lors de l'hydrolyse de phospholipides à longues chaînes, le PA formé restant ancré dans la membrane. C'est pourquoi, Majd et collègues (Majd *et al.*, 2013) ont récemment développé un nouveau modèle pour expliquer ce phénomène d'auto-activation, le modèle étendu de Verger.

1.7.3. Mécanisme catalytique des PLDs à consensus « HKD »

Les réactions d'hydrolyse et de transphosphatidylatation, catalysées par les PLDs à consensus « HKD », font appel à un mécanisme de type ping-pong, tel que décrit dans la figure 36A.

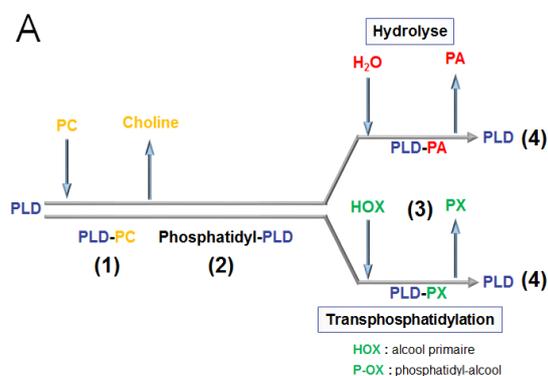
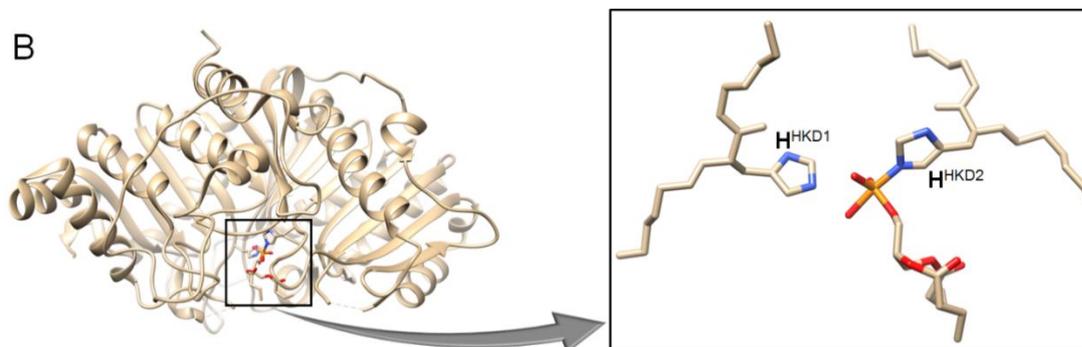


Figure 36 : (A) Mécanisme réactionnel de type ping-pong des PLDs à consensus HKD. Après attaque de la PC (1) et libération de la choline (2), le second substrat (eau ou alcool) est pris en charge par la PLD afin de former le produit de réaction (3 - PA ou PX) et régénérer son site catalytique (4). (B) Structure 3D de la PLD de *Streptomyces* sp. souche PMF, présentant l'intermédiaire covalent phosphatidyl-PLD formé lors de l'hydrolyse de la dibutyryl-PC (PDB : 1V0Y).



En effet, après l'adsorption de la PLD à l'interface lipidique, la catalyse débute par l'attaque de la liaison phosphodiester distale du phospholipide substrat, afin de libérer la tête polaire. Ceci conduit, par ailleurs, à la formation d'un intermédiaire covalent phosphatidyl-PLD (PLD-PA), tel que l'on peut observer sur la structure 3D de la PLD de *Streptomyces* sp. souche PMF, cristallisée en présence de son substrat (Leiros *et al.*, 2000). Par la suite, une molécule d'eau ou d'alcool primaire est transférée sur le groupement phosphatidyle de l'intermédiaire PLD-PA. Ceci permet, *in fine*, de régénérer le site catalytique de la PLD ainsi que de former une molécule de PA ou de phosphatidyl-alcool, en fonction de la nature de l'accepteur nucléophile (eau ou alcool primaire).

Ainsi, cette réaction fait directement intervenir les histidines des motifs HKD, bien que les autres résidus du site catalytique jouent également un rôle important. En effet, l'implication de ces résidus dans la catalyse a notamment été étudiée, *in silico*, par la modélisation moléculaire dynamique de 19 résidus composant le site actif (DeYonker *et al.*, 2013). Cette étude a ainsi permis de déterminer le mécanisme réactionnel de la PLD, qui peut être décrit en 4 étapes successives (Figure 37).

Étape 1 : Dans la première partie de ce mécanisme, le résidu D^(HKD2) établit une liaison hydrogène avec le résidu H^(HKD2). Cette étape permet ainsi de potentialiser l'attaque nucléophile, induite par le groupement amine secondaire de l'histidine, sur la liaison phosphodiester distale du phospholipide substrat.

Étape 2 : L'attaque nucléophile permet de former une liaison phosphoramide avec le résidu H^(HKD2) afin de générer un intermédiaire covalent PLD-phospholipide (PLD-PC, dans le cas de l'hydrolyse de la PC). Cette étape induit alors une délocalisation électronique de la liaison phosphodiester distale du phospholipide, qui va à son tour capter le proton du résidu H^(HKD1). Ceci induit alors la rupture de la liaison phosphodiester, qui conduit d'une part, à la libération de la tête polaire choline (dans le cas de l'hydrolyse de la PC) et d'autre part, à la formation de l'intermédiaire phosphatidyl-PLD. Par ailleurs, cette étape conduit également à une délocalisation électronique du résidu H^(HKD1) qui va à son tour capter le proton du groupement carboxylate du résidu D^(HKD1).

Étape 3 : Le résidu D^(HKD1) potentialise l'attaque nucléophile du résidu H^(HKD1), à l'instar de l'étape 1, sur l'oxygène d'une molécule d'eau ou d'alcool primaire. Ceci conduit ainsi à une délocalisation électronique sur le groupement phosphate de l'intermédiaire phosphatidyl-PLD.

Étape 4 : L'attaque nucléophile du résidu H^(HKD1) conduit au transfert de l'alcool ou du groupement hydroxyle de la molécule d'eau sur le groupement phosphate, afin de former un intermédiaire PLD-phosphatidylalcool ou PLD-PA. Cette liaison instable conduit alors à la rupture de la liaison phosphoramide et aboutit à la libération du phospholipide néosynthétisé ainsi qu'à la régénération du site catalytique de la PLD.

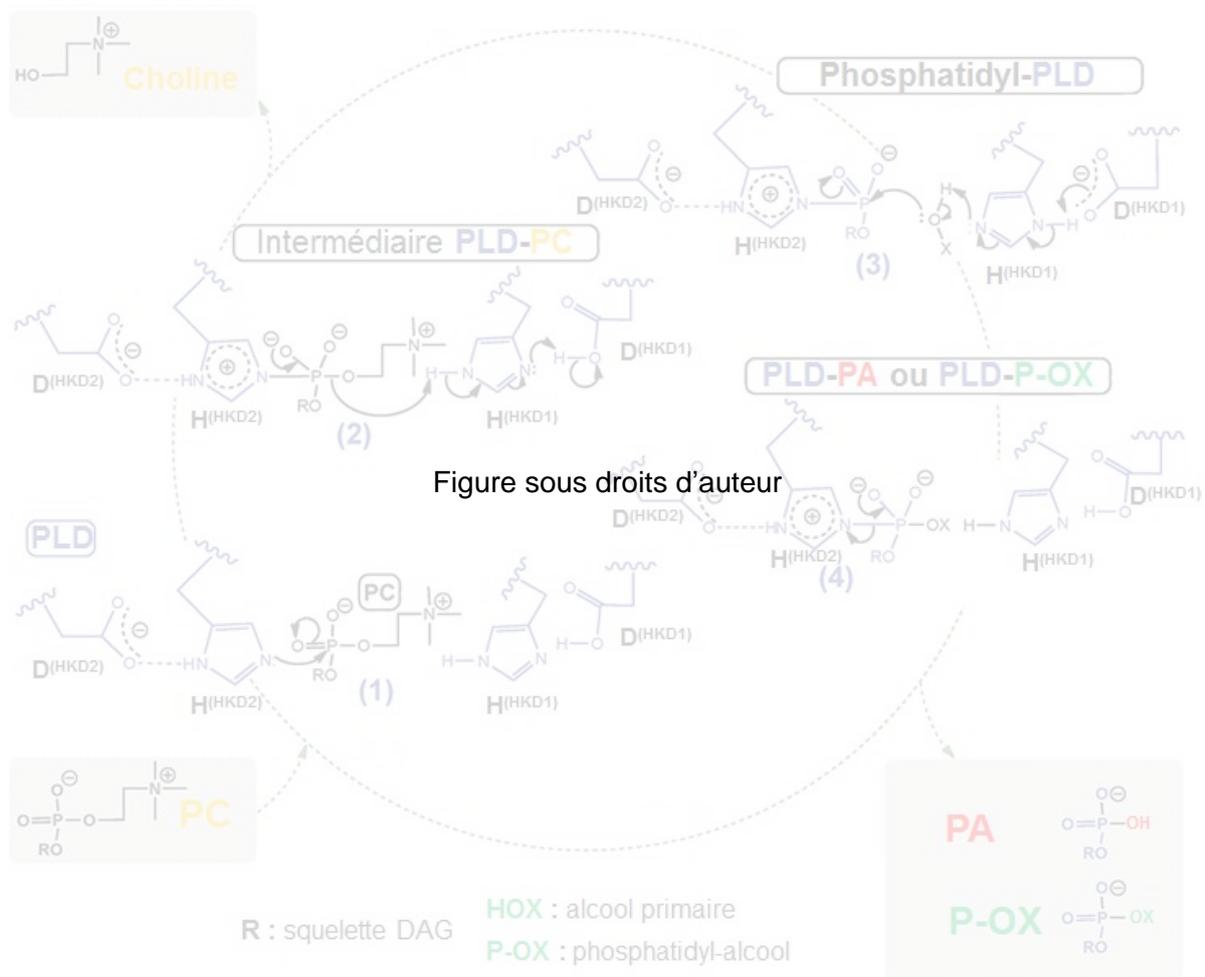


Figure 37 : Mécanisme réactionnel catalysé par la PLD. D'après Selvy *et al.* (2011), avec modifications. Au début du cycle réactionnel (1), le groupement amine du résidu H^(HKD2) effectue une attaque nucléophile sur la PC, conduisant à la formation d'une liaison phosphoramide entre la PLD et la PC (2). Cette liaison est ensuite rompue par le groupement amine du résidu H^(HKD1) afin de libérer la choline et de former un intermédiaire phosphatidyl-PLD. Dans la seconde phase de la réaction, le phénomène inverse se produit. Un proton est cédé par une molécule d'eau ou alcool primaire vers le groupement amine du résidu H^(HKD1) (3), conduisant au transfert de l'alcool ou du groupement hydroxyle de la molécule d'eau sur le groupement phosphate, afin de former un intermédiaire PLD-phosphatidylalcool ou PLD-PA. Enfin la rupture de la liaison phosphoramide permet de libérer le PA ou le phosphatidyl-alcool néosynthétisé (4).

1.7.4. Inhibition des PLDs

1.7.4.1. Nécessité d'inhiber les PLDs

L'inhibition sélective des PLDs représente un enjeu majeur pour le développement de nouvelles thérapies mais également dans la caractérisation du rôle cellulaire de chaque isoforme. En effet, jusqu'à récemment, il n'existait que très peu d'outils pour l'étude du rôle individuel de chaque isoforme. Ainsi, la majorité des travaux de recherche visant à caractériser les voies de signalisation des PLDs a été effectuée à l'aide des techniques de biologie moléculaire, telle que l'interférence ARN ou bien la surexpression protéique. Cependant, bien que ces techniques soient très informatives, il reste néanmoins nécessaire d'analyser les résultats obtenus avec précaution et de les confirmer *via* l'inhibition ciblée de chaque isoforme étudiée.

Cependant, face à l'absence d'inhibiteur spécifique pour chaque isoforme de PLD, un grand nombre d'auteurs se sont vus dans l'obligation d'utiliser les alcools primaires, tels que le butan-1-ol, en tant qu'inhibiteur. En effet, bien qu'il s'agisse en réalité de substrats pour la réaction de transphosphatidylation (Cf. Figure 20), les alcools primaires sont souvent considérés comme des inhibiteurs de la formation de PA, *via* la formation compétitive de phosphatidyl-alcool. Néanmoins, les résultats obtenus par ce type de manipulation doivent, ici encore, être pris avec une très grande précaution. En effet, plusieurs interrogations surgissent, quant aux effets de l'utilisation des alcools sur des cellules en culture, notamment vis-à-vis des effets sur d'autres voies de signalisation.

C'est pourquoi, plusieurs équipes se sont employées à trouver d'autres molécules capables d'inhiber les PLDs de manière directe, en ciblant précisément chaque isoforme, ou bien de manière indirecte, en agissant sur leurs effecteurs.

1.7.4.2. Les inhibiteurs indirects

Les efforts de recherche d'inhibiteurs des PLDs ont ainsi conduit à l'identification de plusieurs composés, capables de se comporter comme des inhibiteurs cellulaires indirects. En effet, bien que ces molécules n'interagissent pas directement avec les PLDs, celles-ci apparaissent, néanmoins, capables d'agir en amont *via* l'inhibition de leurs effecteurs ou bien en diminuant directement leur expression cellulaire. Ainsi, bien que ces composés soient incapables d'inhiber les PLDs *in vitro*, ceux-ci induisent, néanmoins, une diminution de la quantité de PA cellulaire, à l'instar des alcools primaires.

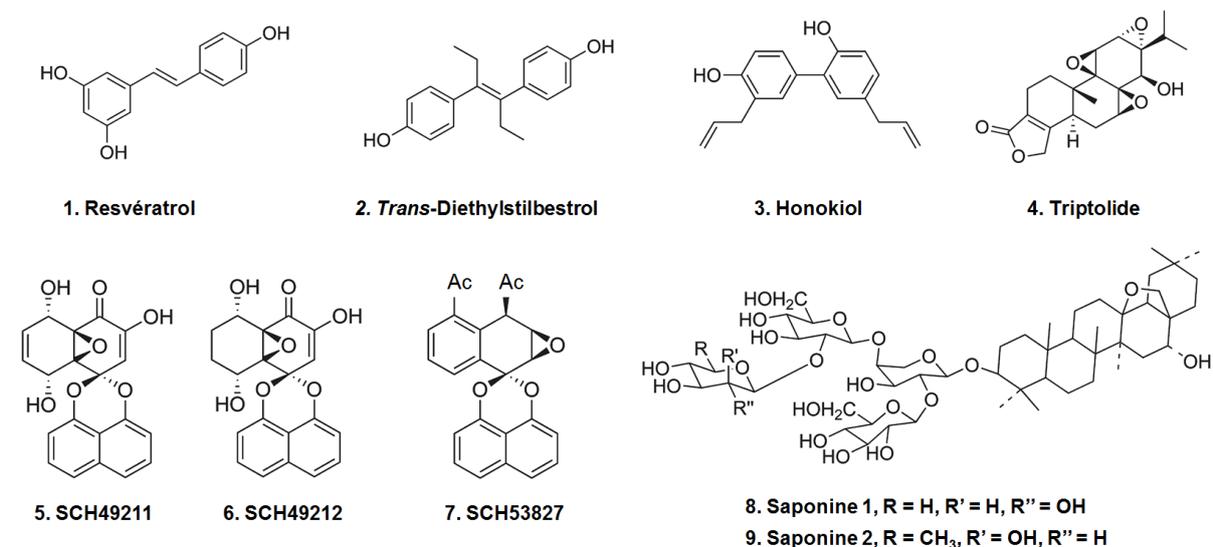


Figure 38 : Structure chimique des composés décrits comme des inhibiteurs indirects, *in cellulo*, de l'activité PLD.

Parmi ces composés, le resvératrol (composé 1, Figure 38) (Tou *et al.*, 2001), un polyphénol trouvé dans la peau des raisins rouges, ainsi que son dérivé synthétique, le *trans*-Diethylstilbestrol (composé 2, Figure 38) (Tou *et al.*, 2008), ont été montrés comme étant capables d'inhiber la production de PA chez les neutrophiles humains. Par ailleurs, ces deux molécules, qui présentent des IC₅₀ de l'ordre de 50 µM, sont également capables d'inhiber la formation de phosphatidyléthanol, confirmant ainsi l'implication de la PLD dans le phénomène observé. Cependant, le resvératrol a également été démontré comme étant capable d'inhiber la formation de DAG et de diglycérides éthérés dans les mêmes cellules, indiquant ainsi que son action s'effectue en amont de la PLD (Tou *et al.*, 2001). Néanmoins, Majd et collègues (Majd *et al.*, 2009), ont récemment rapporté qu'à une concentration de 130 µM, le resvératrol est capable d'inhiber jusqu'à 90% de l'activité de la BoPLD, *in vitro*. Il est, néanmoins, important de noter que les auteurs n'ont testé qu'une seule valeur, et n'ont pas présenté d'IC₅₀.

L'honokiol (composé 3, Figure 38), quant à lui, est un produit naturel qui a été isolé à partir des cônes de *Magnolia grandiflora*. Cette molécule, qui présente des propriétés antimicrobiennes (Clark *et al.*, 1981), anti-angiogéniques (Bai *et al.*, 2003), et pro-apoptotiques (Shigemura *et al.*, 2007), est capable de bloquer la formation de phosphatidylbutanol dans des cellules de tumeur mammaire, à une concentration de 20 µM (Garcia *et al.*, 2008). Cependant, l'honokiol ne présente aucun effet sur l'activité PLD, *in vitro*, indiquant ainsi le caractère indirect de son pouvoir inhibiteur (Garcia *et al.*, 2008).

Le triptolide (composé 4, Figure 38) est un diterpène triépoxyde, isolé à partir *Tripterygium wilfordii*, qui est utilisé en médecine traditionnelle chinoise. Ce composé, qui provient d'un criblage visant à identifier les molécules capables de réduire l'expression

cellulaire des PLD1 et PLD2, dans les cellules de tumeur mammaire (Kang *et al.*, 2009), est actuellement entré en phase d'essai clinique, sous forme de dérivé semi-synthétique (Kitzen *et al.*, 2009). Néanmoins, le triptolide est également capable de réduire l'expression des protéines de choc thermique (Westerheide *et al.*, 2006) et de cibler le facteur de transcription TFIIH (*Transcription factor II H*) (Titov *et al.*, 2011).

Les composés SCH49211 et SCH49212 (composés 5 et 6, Figure 38) sont des ketoepoxydes polycycliques, isolés à partir de cultures du champignon *Natrassia mangiferae*, par Chu et collègues (Chu *et al.*, 1994). Ces deux molécules sont capables d'inhiber l'activité PLD chez les cellules HL60 avec des IC₅₀ de 11 et de 12 µM, respectivement, après stimulation par le fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) (Chu *et al.*, 1994). Par la suite, ces auteurs ont rapporté l'inhibition de l'activité PLD, dans les mêmes cellules, par le composé SCH53827 (composé 7, Figure 38) avec une IC₅₀ de 17 pM (Chu *et al.*, 1996). Cette molécule est un dérivé acétylé du composé SCH53823, isolé à partir de *Ruercus virginiana* (Chu *et al.*, 1996).

Enfin, la saponine 1 et la saponine 2 (composés 8 et 9, Figure 38), isolées à partir de feuilles de *Myrsine australis* sont, quant à elles, capables d'inhiber l'activité PLD chez les cellules HL60 avec des IC₅₀ de 3 et de 2 µM, respectivement, après stimulation par les esters de phorbols avec des IC₅₀ de 8 et de 24 µM, respectivement, après stimulation par le fMLP (Hegde *et al.*, 1995).

Ainsi, tous ces composés présentent un effet inhibiteur, *in vivo*, potentiellement utilisable en santé humaine. Néanmoins, en dépit de leur efficacité, ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques des PLDs et peuvent cibler d'autres voies métaboliques, potentiellement importantes. C'est pourquoi, plusieurs laboratoires se sont investis dans la recherche d'inhibiteur ciblant les PLDs elles-mêmes, de manière directe et spécifique.

1.7.4.3. Les inhibiteurs directs

L'objectif de la recherche d'inhibiteurs directs réside dans la volonté de cibler de manière spécifique les PLDs, voir une isoforme en particulier. Ainsi, comme introduit précédemment (Cf. 1.7.4.1.), l'inhibition ciblée des PLDs permet, d'une part, d'étudier leur rôle spécifique au sein des cellules et, d'autre part, de concevoir des molécules bioactives ne ciblant pas d'autres voies métaboliques. Ainsi, les recherches de ces dernières décennies ont conduit à la découverte de plusieurs composés, qui peuvent être classés en trois catégories : les inhibiteurs mimétiques du phosphate, les inhibiteurs issus de sources naturelles et les inhibiteurs synthétiques.

➤ **Inhibiteurs mimant le groupement phosphate**

Dans cette catégorie d'inhibiteurs, on retrouve des sels d'anions présentant les mêmes propriétés que le groupement phosphate des phospholipides. Ainsi, comme l'ont démontré Li et collègues (Li *et al.*, 1999), on retrouve dans cette catégorie l'orthophosphate lui-même (composé 10, Figure 39) ainsi que l'orthovanadate (composé 11, Figure 39), le fluoroaluminat (composé 12, Figure 39) et le fluorure de béryllium (composé 13, Figure 39), qui sont capables d'inhiber la BoPLD avec des IC₅₀ respectives de 10 mM (10), 35 µM (11), 15 µM (12) et 3 mM (13) (Li *et al.*, 1999). Par ailleurs, parmi ces composés, l'orthovanadate apparaît intéressant, puisqu'il s'agit d'un oxyanion, à l'instar du phosphate, qui est également capable d'inhiber la PLD de *Brassica juncea* avec une IC₅₀ de 33 µM (Khatoon *et al.*, 2015).

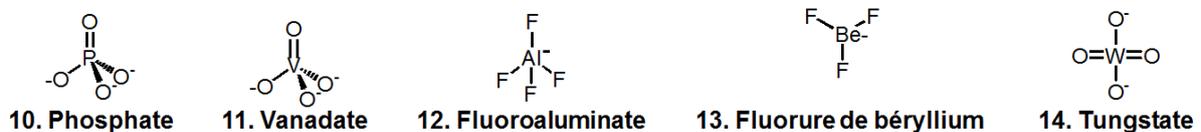


Figure 39 : Composés mimant le groupement phosphate des phospholipides et capables d'inhiber de manière compétitive les PLDs, *in vitro*.

Ainsi, ces sels d'anions seraient en mesure d'inhiber de manière compétitive les PLDs, en interagissant avec l'une des histidines du site catalytique. En effet, lors de leurs essais de cristallisation, Leiros et collègues (Leiros *et al.*, 2000) sont notamment parvenus à déterminer la structure 3D de la PLD de *Streptomyces* sp. souche PMF, complexée avec les ions tungstate (PDB : 1V0R). En effet, le tungstène, qui compose le tungstate (composé 14, Figure 39), est un atome lourd couramment utilisé pour obtenir l'information de phase, en cristallographie des protéines. Ainsi, cette technique de MAD (*Multi-wavelength anomalous diffraction*) a notamment été utilisée par Abergel et collègues (Abergel *et al.*, 2001) afin de tenter de résoudre la structure de la VuPLD α (Cf. 1.5.3.4.). Ces auteurs ont déterminé que 1 mM de tungstate était suffisant pour inhiber 40% de l'activité (Abergel *et al.*, 2001).

Néanmoins, bien que les sels d'anions soient des inhibiteurs directs des PLDs, ceux-ci ne sont pas assez spécifiques pour une utilisation *in cellulo*. En effet, ces composés sont également capables d'inhiber des nucléases, telles que l'endonucléase Nuc (PDB : 1BYS) (Stuckey *et al.*, 1999). C'est pourquoi, différents laboratoires se sont investis dans la recherche d'inhibiteurs issus de sources naturelles.

➤ **Inhibiteurs provenant de sources naturelles**

Parmi les composés issus de sources naturelles, le présqualène diphosphate (composé 15, Figure 40) ainsi que ses dérivées, sont capables d'inhiber la PLD1 humaine, avec une $IC_{50} > 1 \mu M$ mais également la ScPLD avec une IC_{50} de 100 nM. Ainsi, le présqualène diphosphate permettrait de réduire la production de ROS, chez les leucocytes humains, *via* l'inhibition de la production de PA par la PLD1 (Cf. 1.2.2.5.).

Concernant la curcumine (composé 16, Figure 40), cette molécule est issue du *Curcuma longa*, notamment utilisé en médecine ayurvédique pour ses vertus anti-inflammatoires. Il s'agit d'un composé polyphénolique, principalement capable d'inhiber l'activité PLD de macrophages de souris, avec une IC_{50} de 10 μM , mais également, dans une moindre mesure, les activités PLA_2 et PLC des mêmes cellules (Yamamoto *et al.*, 1997).

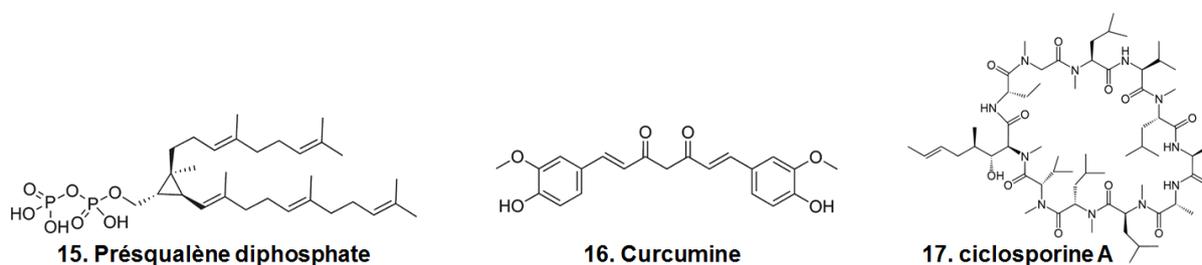


Figure 40 : Composés issus de sources naturelles inhibant de manière directe les PLDs d'origines eucaryotes ou procaryotes.

Enfin, la ciclosporine A (composé 17, Figure 40), issue du champignon *Tolypocladium inflatum*, est un peptide cyclique qui présente des propriétés immunosuppressives, en inhibant la synthèse de l'interleukine 2 chez les lymphocytes T (Foxwell *et al.*, 1990). Cependant, la ciclosporine A serait également capable d'inhiber l'activité PLD des mitochondries des cellules intestinales de rat (Madesh *et al.*, 1998) ainsi que la BoPLD partiellement purifiée (Majd *et al.*, 2009), bien qu'aucune IC_{50} n'ait été déterminée dans les deux cas.

➤ **Inhibiteurs de synthèse**

C'est en 2007 que la recherche d'inhibiteurs de PLDs a pris un nouvel essor, avec l'identification de l'halopémide (composé 18, Figure 41), suite à un criblage sur la PLD2 humaine (hPLD2), par la société Novartis (Monovich *et al.*, 2007). En effet, l'halopémide est un composé capable d'inhiber la hPLD2 avec des IC_{50} de 310 nM, *in vitro*, et de 300 nM, *in cellulo*, mais également la hPLD1 avec des IC_{50} de 220 nM, *in vitro*, et de 21 nM, *in cellulo* (Scott *et al.*, 2009). Ces résultats ont conduit les mêmes auteurs (Monovich *et al.*, 2007) à développer plusieurs dérivés, dont le FIPI (composé 19, Figure 41) qui présente, quant à lui, des IC_{50} de 17 nM, *in vitro*, et de 44 nM, *in cellulo*, pour la hPLD2 ainsi que des IC_{50} de 9,5 nM, *in vitro*, et de 1 nM, *in cellulo*, pour la hPLD1 (Scott *et al.*, 2009).

Néanmoins, comme le montrent leurs IC_{50} , l'halopéamide et le FIPI ne présentent pas de réelle spécificité vis-à-vis de l'isoforme étudiée, se comportant ainsi comme des inhibiteurs non sélectifs de la hPLD1 et de la hPLD2. C'est pourquoi, Scott et collègues (Scott *et al.*, 2009) ont, par la suite, développé plusieurs composés dérivant de l'halopéamide, dont le VU0359595 (composé 20, Figure 41) et le VU0285655 (composé 21, Figure 41), qui présentent une inhibition sélective pour chaque isoforme. Ainsi, le VU0359595 (20) est capable d'inhiber les hPLD1 et hPLD2 avec des IC_{50} respectives de 3,7 nM et de 6 400 nM, *in vitro*, tandis que le VU0285655 (21) présente, quant à lui, des IC_{50} de 1900 nM et de 90 nM, pour les hPLD1 et hPLD2 (Scott *et al.*, 2009). Ainsi, la synthèse de ces inhibiteurs représente une avancée majeure dans la caractérisation biologique des PLDs ainsi que dans le développement de nouvelles thérapies.

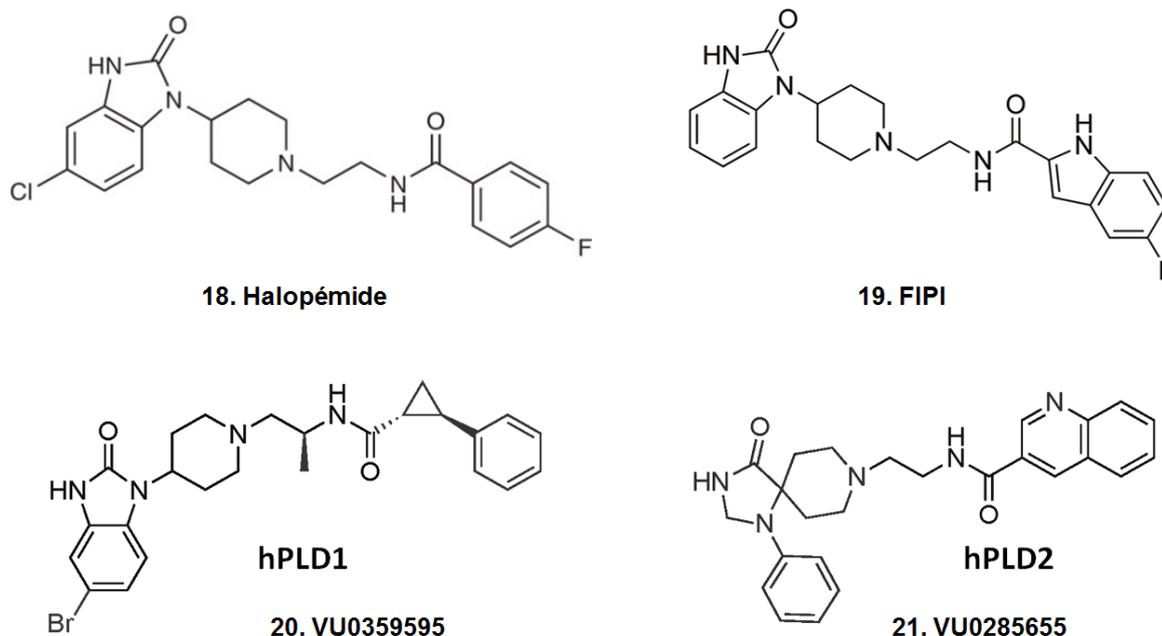


Figure 41 : Structures chimiques de l'halopéamide et de ses dérivés. Les composés VU0359595 et VU0285655 sont des inhibiteurs spécifiques de la hPLD1 et de la hPLD2, respectivement.

Néanmoins, ces composés sont, à l'heure actuelle, les seuls inhibiteurs disponibles et le manque de diversité peut être imputé à la faiblesse des tests utilisés actuellement.

1.8. Méthodes de mesure des activités PLD

Compte tenu du rôle central de la PLD dans les processus cellulaires cités précédemment, la mesure de son activité enzymatique représente une étape essentielle à sa caractérisation biochimique. En effet, du point de vue de la cellule, les enzymes ne sont pas que de simples catalyseurs biochimiques mais de véritables outils qui nécessitent d'être finement régulés. Ceci représente un aspect essentiel de la biologie cellulaire, au sein de laquelle, la cellule se doit de maintenir un certain équilibre afin d'éviter tout comportement anarchique et *a fortiori*, le développement de certaines pathologies.

Cependant, l'étude de la cellule, elle-même, ne permet pas d'apprécier toutes les subtilités de la régulation des enzymes, la présence d'activateurs ou d'inhibiteurs ainsi que la disponibilité en substrat n'étant pas contrôlées. *A contrario*, l'étude *in vitro* d'enzymes purifiées permet de disséquer les mécanismes de catalyse et de régulation, mettant notamment en lumière leur spécificité d'action vis-à-vis de certains substrats ou encore les rôles précis de cofacteurs / régulateurs de certaines molécules. Dans cette optique, le développement de méthodes permettant d'étudier les activités enzymatiques *in vitro* revêt une importance fondamentale.

À ce jour, plusieurs méthodes ont été mises au point afin de mesurer les activités PLD. Celles-ci utilisent différentes techniques physico-chimiques usuellement employées dans les laboratoires de biochimie et basées sur le dosage de la disparition du substrat ou l'apparition du produit lors de la réaction de lipolyse. Ces méthodes qui peuvent être continues ou discontinues diffèrent sur le mode de présentation du substrat à l'enzyme. On peut les subdiviser en deux catégories : les méthodes *in vitro* utilisant des substrats exogènes et les méthodes *in vivo* utilisant des substrats incorporés dans le métabolisme cellulaire.

1.8.1. Dosage par radioactivité

La radioactivité est l'une des méthodes de mesure les plus sensibles, qui permet de doser de très faibles activités enzymatiques. Cette méthode emploie des phospholipides substrats marqués sur leur tête polaire ou au niveau de leurs chaînes acyles, par des atomes radioactifs tels que le tritium, le carbone 14 ou encore le phosphore 32. Ainsi, après réaction et séparation, les produits peuvent être quantifiés à l'aide d'un compteur à scintillation (Figure 42). L'utilisation de la radioactivité présente l'avantage d'être très polyvalente, permettant de doser les activités PLD aussi bien *in vitro* que directement sur des cellules en culture.

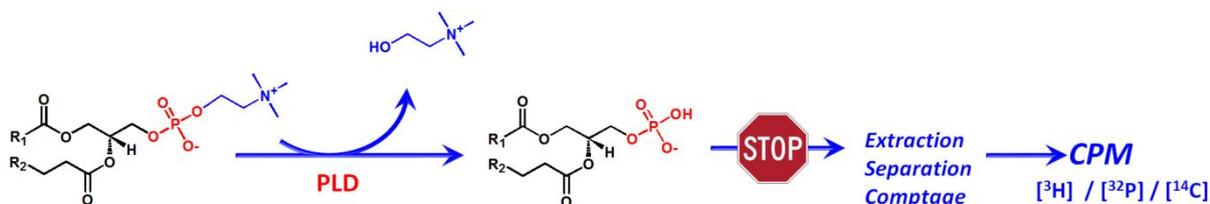


Figure 42 : Principe du dosage des activités PLD par radioactivité. Après réaction, le produit radiomarqué est séparé du substrat et la radioactivité est dosée à l'aide d'un compteur à scintillation, qui mesure le nombre de désintégrations par minute (CPM).

1.8.1.1. Dosage *in vitro*

In vitro, la mesure des activités PLD peut s'effectuer par dosage de la radioactivité, lors des réactions d'hydrolyse ou de transphosphatidyltion, par ajout d'une molécule d'alcool primaire. Ainsi, dans ces procédures, la choline tritiée ($[^3\text{H}]$ -choline) est quantifiée lors de l'hydrolyse de la $[^3\text{H}]$ -choline-PC par la PLD. Ce test enzymatique permet d'étudier l'effet de la composition de PC en chaînes acyles sur l'activité PLD (Vinggaard *et al.*, 1996). Après la réaction et séparation (Figure 42), la $[^3\text{H}]$ -choline libre, contenue dans la phase aqueuse, est quantifiée par un compteur à scintillation liquide. Par ailleurs, le substrat peut également être radiomarqué au ^3H sur les chaînes acyles ou au ^{32}P sur le squelette glycérol (Bailey *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 1967), permettant de doser le produit de réaction, après extraction et séparation (Figure 42).

1.8.1.2. Dosage *in vivo*

In vivo, la mesure des activités PLD se base sur la propriété unique des PLDs à effectuer la réaction de transphosphatidyltion, tel que décrit par Randall et collègues (Randall *et al.*, 1990). Ainsi, les cellules sont mises en culture en présence d'un acide gras radiomarqué, qui sera incorporé dans les phospholipides membranaires, permettant de générer des phospholipides radiomarqués. L'addition subséquente d'un alcool primaire permettra, alors, la synthèse de phosphatidyl-alcool, *via* la réaction de transphosphatidyltion. Ainsi, après culture, les cellules sont lysées et le phosphatidyl-alcool radiomarqué est extrait, séparé et quantifié (Figure 42).

1.8.2. Dosage à l'aide de phospholipides synthétiques

Bien que la radioactivité soit l'une des méthodes les plus sensibles, il s'agit, néanmoins, d'une méthode discontinue qui nécessite la séparation préalable des produits et des substrats, avant dosage. Par ailleurs, cette méthode présente également des contraintes techniques importantes, telles que l'utilisation d'équipements spécialisés, ainsi que d'autorisations par les autorités sanitaires. C'est pourquoi plusieurs équipes se sont tournées vers l'emploi de substrats synthétiques portant des groupements fluorescents tel que le NBD

(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-yl) (Figure 43), qui permet de visualiser les produits de réaction par illumination sous rayonnements ultraviolets (UV). De cette manière, Pappan *et al.* ont été en mesure de doser l'activité des PLD α , - β et - γ en utilisant du phosphatidylglycérol marqué avec une molécule de NBD sur l'une de ses chaînes acyles (Pappan *et al.*, 1998).

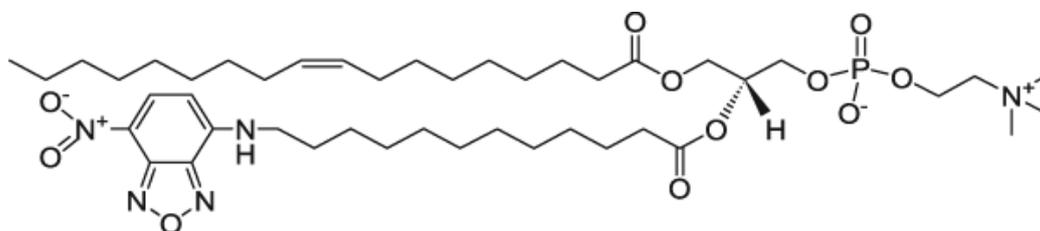


Figure 43 : Structure du NBD-PC, qui présente un groupement NBD fluorescent sur la chaîne acyle en position *sn*-2.

Ainsi, l'utilisation de molécules fluorescentes représente un bon compromis en termes de simplicité d'utilisation et de sensibilité de détection, et plusieurs équipes ont, par conséquent, cherché à développer des tests pour la mesure continue des activités PLD. Pour cela, la stratégie employée repose sur l'utilisation de substrats portant un groupement fluorescent sur leur tête polaire. Cependant, dans ces conditions, les fluorophores utilisés présentent un signal de fluorescence basal, qu'ils soient liés au phospholipide substrat ou bien libres en solution, nécessitant une séparation du produit et du substrat, à l'instar de la radioactivité.

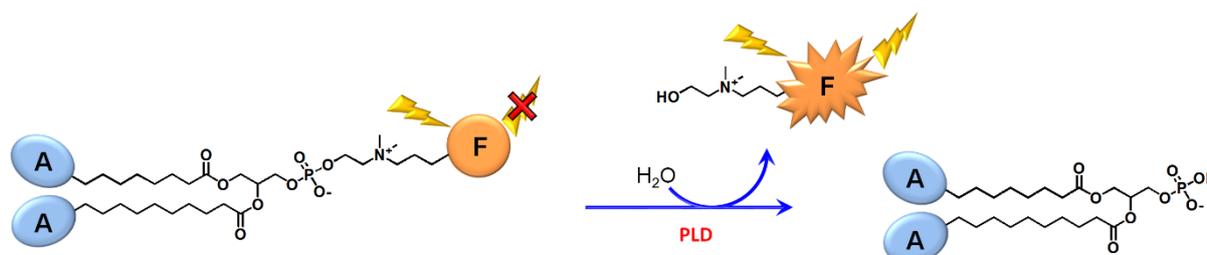


Figure 44 : Représentation schématique du test basé sur l'utilisation de substrats synthétiques composés de groupements fluorophore (F) et atténuateur de fluorescence (A) (Rose *et al.*, 2006).

Ainsi, afin de pouvoir obtenir un signal de fluorescence dû uniquement à la libération de la tête polaire, plusieurs équipes ont associé l'utilisation de fluorophores à celle d'atténuateurs de fluorescence. Ainsi, Rose et collègues (Rose *et al.*, 2006) ont rapporté la synthèse d'un phospholipide comportant une tête polaire fluorescente, additionnée de groupements atténuateurs de fluorescence liés à chacune des chaînes acyles (Rose *et al.*, 2006). De cette manière, comme on peut l'observer sur la figure 44, la tête polaire du substrat synthétique ne présente qu'une très faible intensité de fluorescence tandis que sa libération, induite par la réaction PLD, conduit à la formation d'un produit quantifiable par sa fluorescence.

Une stratégie similaire a été employée par Liu et collègues (Liu *et al.*, 2012) qui ont, quant à eux, immobilisé les phospholipides substrats sous forme de monocouche sur un film de graphène. Cette procédure permet ainsi, comme le montre la figure 45A, d'utiliser des chaînes acyles non modifiées, le graphène jouant le rôle d'atténuateur de fluorescence.

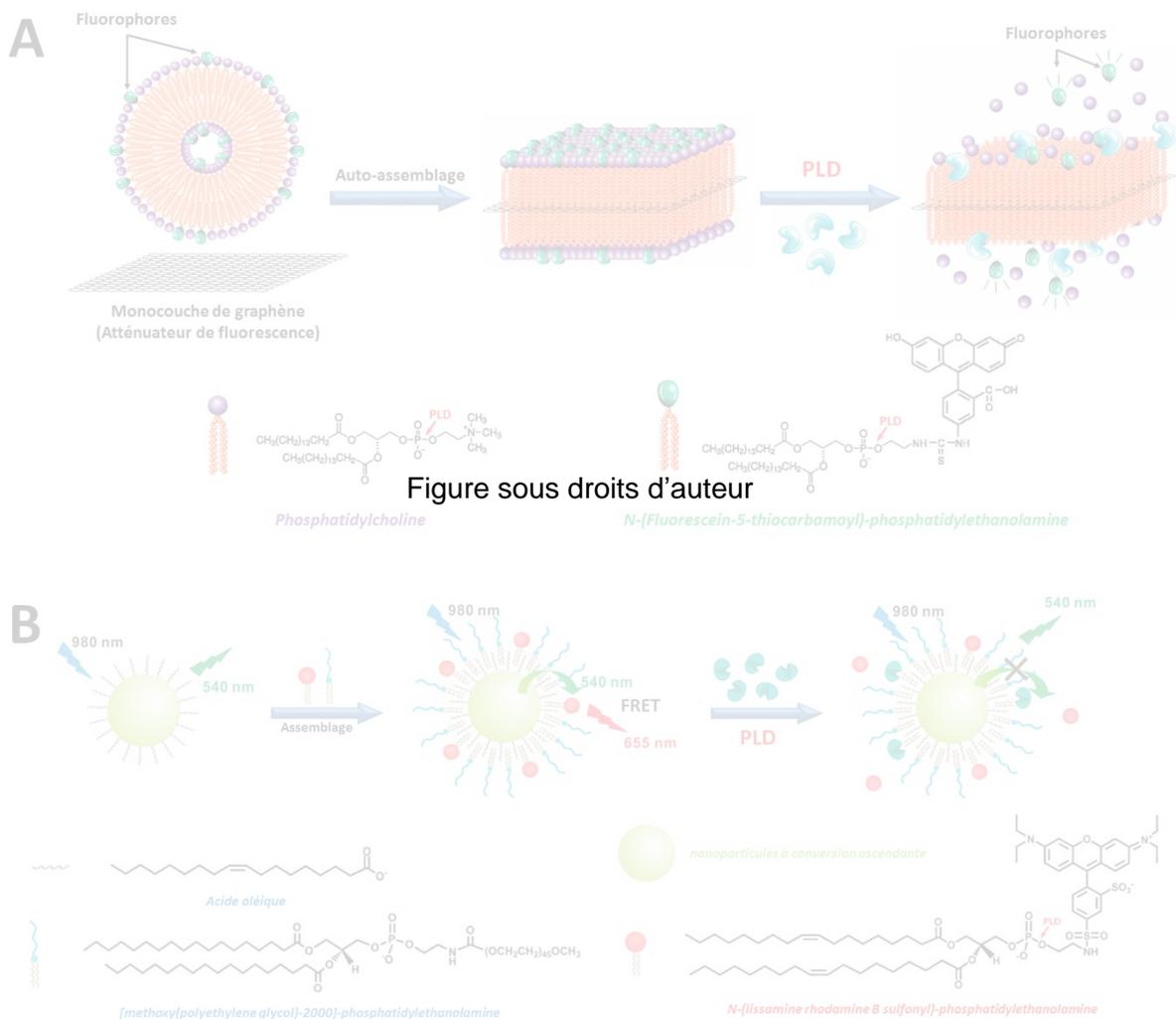


Figure 45 : (A) Représentation schématique du test utilisant le graphène comme atténuateur de fluorescence pour la mesure des activités PLD. D'après Liu *et al.* (2012), avec modifications. (B) Représentation schématique du test à conversion ascendante. D'après Cen *et al.* (2014), avec modifications.

Une autre approche, rapportée par Cen et collègues (Cen *et al.*, 2014) consiste, cette fois-ci, à immobiliser les substrats fluorescents sur un support, lui-même fluorescent. Cette stratégie repose sur la propriété de fluorescence ascendante de certains matériaux, dont l'excitation dans le domaine de l'infrarouge conduit à une ré-émission de fluorescence dans le domaine du visible à 540 nm (Figure 45B). Cependant, cette fluorescence peut être judicieusement utilisée pour exciter un second fluorophore lié à la tête polaire des phospholipides immobilisés, grâce au phénomène de transfert d'énergie de type Förster. L'assemblage ainsi formé présente une fluorescence rouge (à 655 nm) qui diminue au fur et

à mesure de la réaction PLD, pour laisser place à une fluorescence verte (à 540 nm), le rapport des deux signaux permettant de suivre de manière précise l'activité enzymatique. Cependant, bien que ces méthodes soient très sensibles, une question relative à leur spécificité vis-à-vis de la PLD reste inconnue. En effet, à l'instar de la PLD, la PLC est elle-aussi capable de libérer la tête polaire de ces phospholipides substrats, induisant par conséquent une augmentation du signal de fluorescence.

De manière similaire, d'Arrigo et collègues (D'Arrigo *et al.*, 1995) ont rapporté la synthèse d'un phospholipide substrat comportant un groupement chromogénique, le *p*-nitrophenol, lié à sa tête polaire (Figure 46). Cependant, le *p*-nitrophenol, et *a fortiori* le phospholipide synthétique, présente la propriété remarquable de ne pas absorber la lumière visible, lorsqu'il est lié à un groupement phosphate. Ainsi, à l'inverse des tests présentés précédemment, ce test est insensible à l'action de la PLC, tandis que son hydrolyse par la PLD induit la libération du chromophore, quantifiable par son absorbance à 405 nm.

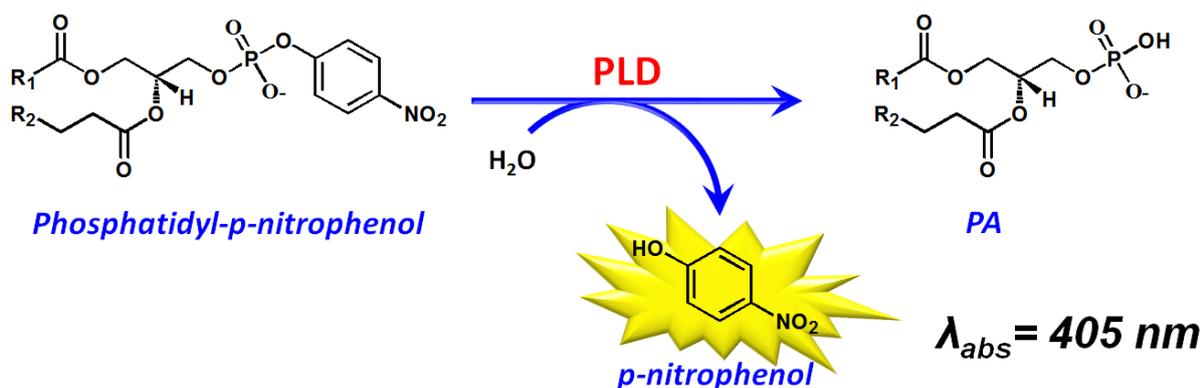


Figure 46 : Représentation schématique du test enzymatique de la PLD basé sur l'utilisation du phosphatidyl-*p*-nitrophenol (D'Arrigo *et al.*, 1995).

1.8.3. Dosage par réactions couplées

En dépit de leurs qualités, les tests présentés précédemment présentent l'inconvénient de se fonder sur l'utilisation de substrats synthétiques. Ceci empêche, par conséquent, l'étude des paramètres cinétiques de la PLD vis-à-vis des substrats naturels ou bien la détermination de sa spécificité de substrat vis-à-vis des têtes polaires. Par ailleurs, les groupements chromophores et fluorophores de ces phospholipides sont composés de cycles aromatiques qui induisent un encombrement stérique important et risquent ainsi d'empêcher une prise en charge optimale par le site actif de l'enzyme.

1.8.3.1. Dosage de la choline

Afin de pallier ce problème, Takrama et collègues (Takrama *et al.*, 1991) ont développé une méthode de dosage des activités PLD qui est fondée sur la quantification de la choline libérée lors de l'hydrolyse de la PC (Figure 47). Dans ce test couplé, la choline

libre est prise en charge par la choline oxydase afin de former du peroxyde d'hydrogène, lui-même substrat de la peroxydase, permettant finalement de former des produits chromogéniques (Takrama *et al.*, 1991) ou fluorescents (Zhou *et al.*, 2000).

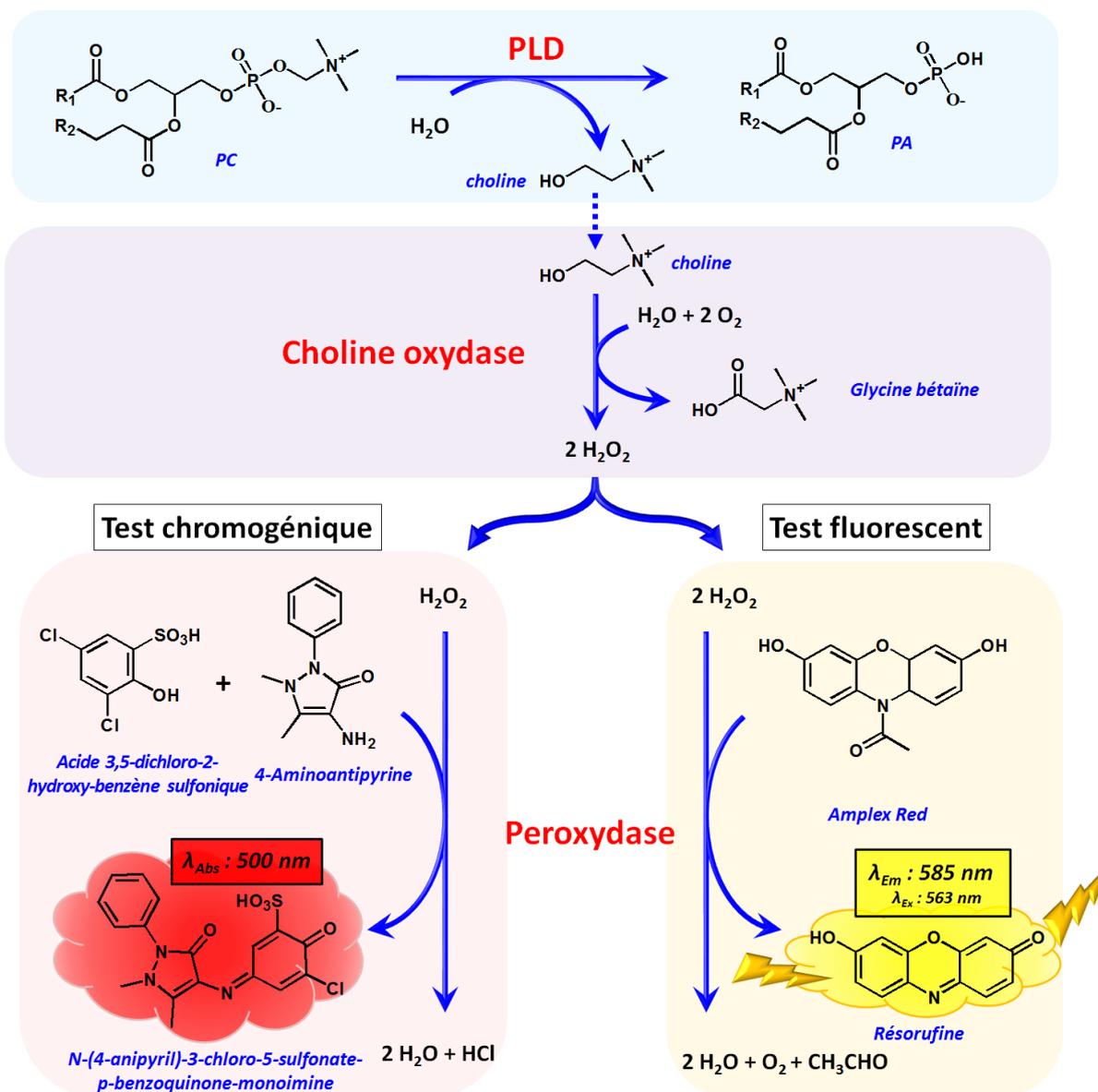


Figure 47 : Représentation schématique du test PLD basé sur le dosage de la choline libérée lors de la réaction d'hydrolyse, en utilisant les réactions couplées choline oxydase / peroxydase, par absorbance (Takrama *et al.*, 1991) ou par fluorescence (Zhou *et al.*, 2000).

Ainsi, en présence de 4-aminoantipyrine et de l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique, la libération de la choline conduit à la formation d'un chromophore (le N-(4-anipryl)-3-chloro-5-sulfonate-*p*-benzoquinone-monoimine) capable d'absorber à 500 nm. De la même manière, la prise en charge de l'Amplex Red (N-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) par la peroxydase conduit à la formation de la résorufine, fluorescente à 585 nm, tel qu'indiqué dans la figure 47 (Zhou *et al.*, 2000).

Cependant, de la même manière que les tests basés sur l'utilisation de phospholipides modifiés, ce test couplé présente l'inconvénient d'être limité à l'utilisation d'un seul type de substrat (la PC), bien que Sato et collègues (Sato *et al.*, 2000) aient rapporté l'utilisation de la glycérol-oxydase pour le suivi de l'hydrolyse du PG par la PLD de *Brassica oleacera* (Sato *et al.*, 2000).

1.8.3.2. Dosage de l'acide phosphatidique

Puisque la réaction d'hydrolyse catalysée par la PLD forme invariablement du PA, son dosage représente la solution la plus simple et la plus adaptée à la détermination de la spécificité de substrat de la PLD. Dans cette optique, Abousalham et collègues (Abousalham *et al.*, 1996) ont développé une méthode de quantification du PA, par mesure de la pression de surface (π) à l'interface de monocouches de Langmuir. Cette technique est basée sur la mesure de la tension superficielle d'un film lipidique, étalé à la surface d'un tampon aqueux, tout au long de la lipolyse (Figure 48). En effet, les molécules lipidiques déposées à la surface d'un tampon (interface eau/air) s'étalent sur toute la surface disponible, en formant un film monomoléculaire (Cf 1.2.3.1.). Le film monomoléculaire ainsi obtenu peut être progressivement comprimé grâce à un système de barrières mobiles en téflon, qui se déplacent à la surface de la cuve réservoir. L'aire occupée par le film lipidique peut être contrôlée tandis qu'une électromicrobalance reliée à une lame de platine dépolie (lame de Wilhelmy) mesure en continu la tension superficielle.

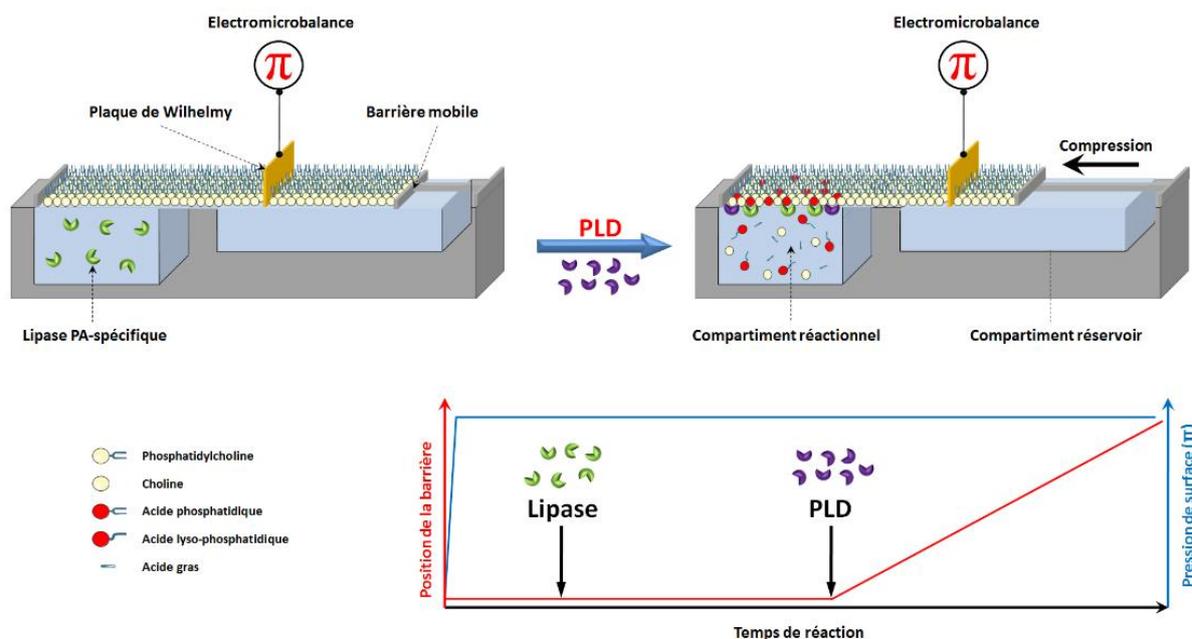


Figure 48 : Représentation schématique du test de mesure des activités PLD à l'interface de monocouches de Langmuir (Abousalham *et al.*, 1996). Le PA, généré sous l'action de la PLD, est hydrolysé par une lipase, qui agit uniquement sur le PA et non sur la PC. La formation de lyso-PA, induit alors une diminution de la pression de surface, qui peut être mesurée.

Ainsi, l'action de la PLD sur un film monomoléculaire de PC libère la choline qui est soluble dans la phase aqueuse tandis que le PA reste à l'interface (Figure 48). Ce dernier est alors spécifiquement hydrolysé par une lipase, préalablement injectée en excès dans la phase aqueuse. Cette lipase agit uniquement sur le PA et non sur la PC, en libérant ainsi le lyso-PA, aboutissant, *in fine*, à une diminution de la pression de surface. Par conséquent, la technique des films monomoléculaires apparaît particulièrement intéressante, puisqu'il s'agit de la seule technique où la physico-chimie de l'interface (qualité interfaciale) est parfaitement connue et régulée tout au long de la réaction enzymatique, ce qui n'est pas le cas pour les liposomes ou les solutions micellaires. Cela représente, ainsi, un avantage majeur pour l'interprétation des cinétiques de lipolyse enzymatique au niveau moléculaire. Néanmoins, cette technique requiert l'utilisation d'un appareillage spécialisé et n'est par conséquent pas utilisable dans tous les laboratoires.

C'est pourquoi, Martin et collègues (Martin *et al.*, 2000) ont développé une méthode de dosage du phosphate organique, généré par la phosphatase alcaline, suite à la formation de PA par la PLD (Figure 49). Ainsi, le phosphate inorganique libéré est quantifié grâce à la formation de bleu de molybdène, en présence de molybdate d'ammonium et d'acide ascorbique.

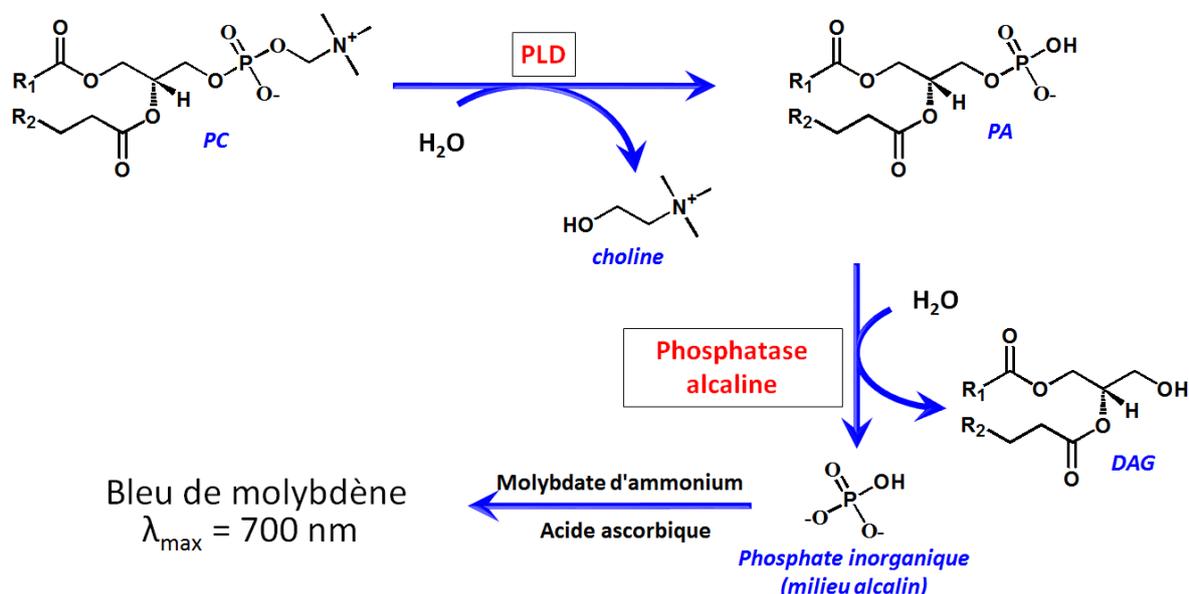


Figure 49 : Représentation schématique du test PLD basé sur le dosage du phosphate inorganique, suite à sa libération par la phosphatase alcaline, formant du bleu de molybdène, en présence de molybdate d'ammonium et d'acide ascorbique (Martin *et al.*, 2000).

1.8.4. Autres méthodes de dosage du PA

Bien que les techniques présentées précédemment apparaissent simples à mettre en œuvre, celles-ci requièrent, néanmoins, l'utilisation d'enzymes couplées. Ainsi, la mise en place de ce type de système oblige à prendre en compte l'efficacité de catalyse de(s) enzyme(s) couplée(s), qui se traduit expérimentalement par l'apparition d'un temps de latence. C'est pourquoi, afin d'éviter l'utilisation d'enzymes supplémentaires pour le dosage du PA, Dippe et Ulbrich-Hofmann (Dippe *et al.*, 2009a) ont mis au point une nouvelle méthode de mesure de l'activité PLD.

Celle-ci se base sur un phénomène de compétition pour la complexation des ions ferriques (Fe^{3+}) entre l'acide salicylique et groupement phosphate du PA (Dippe *et al.*, 2009a). Dans ce test (Figure 50), l'acide salicylique forme un complexe avec le Fe^{3+} qui absorbe à 490 nm. Ainsi, lors de la formation de PA par la PLD, ce complexe se dissocie au profit de la formation d'un nouveau complexe PA/ Fe^{3+} , induisant une diminution de l'absorbance. Par conséquent, cette méthode de dosage ne requiert pas d'enzymes supplémentaires, comme c'est le cas pour les méthodes précédentes (Cf. Figure 48 et Figure 49). Cependant, cette méthode présente l'inconvénient d'être discontinuée, obligeant un arrêt de la réaction pour chaque prise d'essai, à l'instar de la radioactivité.

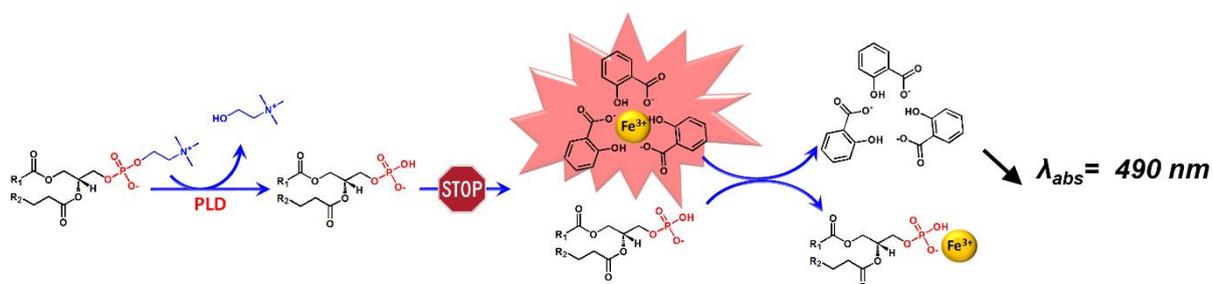


Figure 50 : Représentation schématique du test PLD basé sur la compétition pour le Fe^{3+} entre l'acide salicylique et le PA, suite à la réaction d'hydrolyse (Dippe *et al.*, 2009).

Enfin, une méthode directe de dosage du PA généré par la PLD a récemment été développée par Do *et al.*, (Do *et al.*, 2012). Cette méthode se base quant à elle sur les différences d'absorbance des phospholipides et en particulier du PA dans le domaine de l'infrarouge. Néanmoins, ce test requiert l'ajout de substrat et de PLD dans une concentration importante, limitant par conséquent son utilisation.

1.8.5. Sondes fluorescentes potentiellement utilisables pour la mesure des activités PLD

Bien que les méthodes présentées précédemment s'avèrent tout à fait adaptées à la mesure des activités PLD, celles-ci présentent, néanmoins, plusieurs inconvénients qui limitent leur utilisation. En effet, la radioactivité est l'une des méthodes les plus sensibles mais apparaît contraignante à mettre en œuvre. À l'inverse, les méthodes utilisant des enzymes couplées s'avèrent simples à manipuler mais présentent également plusieurs désavantages, tels qu'une faible sensibilité ainsi que la limitation à l'utilisation de la PC en tant que substrat, dans le cas de l'utilisation du test choline oxydase / peroxydase. Ainsi, l'utilisation de fluorophores apparaît tout à fait adaptée pour pallier ces problèmes en alliant sensibilité de détection avec simplicité d'utilisation. Néanmoins, là encore cette stratégie présente un inconvénient, puisque leur utilisation nécessite généralement l'utilisation de substrats synthétiques. Ainsi, parmi les méthodes présentées, la mesure du PA par compétition avec l'acide salicylique pour le Fe^{3+} (Dippe *et al.*, 2009a), présentée dans la figure 50, s'avère la plus polyvalente. Cependant, comme indiqué précédemment, cette méthode de dosage s'effectue de manière discontinue et présente une faible sensibilité.

Par conséquent, l'utilisation de petites molécules fluorescentes membranaires capables de doser le PA apparaît être une solution prometteuse, afin de pallier ces problèmes.

1.8.5.1. Principe de la spectroscopie de fluorescence

La fluorescence est un phénomène physique où une molécule, appelée fluorophore, est capable d'absorber de l'énergie sous forme de photon, généralement dans le domaine de l'UV. Ces molécules sont en majorité aromatiques et présentent une délocalisation électronique (liaisons π), capable d'absorber (excitation) et de restituer (émission) de l'énergie. Ainsi, l'énergie est restituée sous la forme de photons, généralement dans le domaine du visible (de plus faible énergie).

Ce phénomène peut être illustré par le diagramme de Perrin–Jablonski (Valeur, 2001), présenté dans la figure 51. En effet, lors du phénomène de fluorescence, l'absorption d'énergie par le fluorophore induit un changement de sa configuration électronique, passant de l'état fondamental (S_0) vers des états excités (S_1 ou S_2). Suite à cette absorption, le fluorophore retourne à son état fondamental (S_0) *via* une perte d'énergie radiative (émission de photons) que l'on nomme phénomène de fluorescence.

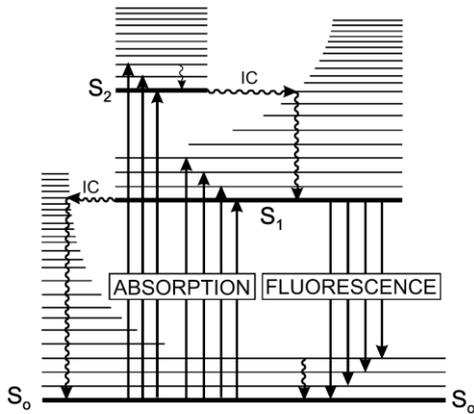


Figure 51 : Diagramme de Perrin–Jablonski illustrant le passage de l'état fondamental (S_0) d'un fluorophore vers les états excités (S_1 ou S_2), suite à l'absorption d'un photon et conduisant au phénomène de fluorescence. Les phénomènes de conversion interne (IC) représentent une perte d'énergie de manière non-radiative entre deux états électroniques (S_1 vers S_0 ou S_2 vers S_1). D'après Valeur (2001), avec modifications.

Néanmoins, ce phénomène s'accompagne généralement d'une perte d'énergie concomitante, non-radiative, entre deux états électroniques (S_1 vers S_0 ou S_2 vers S_1), appelées phénomène de conversion interne (IC). Par ailleurs, pour que le phénomène de fluorescence puisse se produire, il est nécessaire que les photons absorbés possèdent une énergie spécifique, qui est propre à chaque fluorophore. Cette énergie peut également s'exprimer en termes de longueur d'onde, à l'instar du phénomène d'absorbance, le fluorophore étant excité à une longueur d'onde spécifique (longueur d'onde d'excitation).

Ainsi, le fluorophore réémet à une longueur d'onde (longueur d'onde d'émission) supérieure à la longueur d'onde d'excitation (énergie plus faible), due à la perte d'énergie suite au phénomène de conversion interne. Ainsi, la différence entre le maximum d'excitation et d'émission est appelée déplacement de Stokes, tandis que le rendement quantique représente le nombre de photons absorbés par rapport au nombre de photons réémis.

1.8.5.2. Sondes fluorescentes sensibles à l'environnement membranaire

À ce jour, il existe de nombreuses molécules fluorescentes liposolubles, capables de s'insérer dans les membranes cellulaires. Ainsi, certains de ces fluorophores, sensibles à l'environnement membranaire, ont été utilisés afin de détecter le changement de polarité des membranes ou bien de fluidité membranaire. C'est notamment le cas du Laurdan, sensible à la fluidité et à la polarité membranaire (Parasassi *et al.*, 1991), qui a été utilisé par Stock et collègues (Stock *et al.*, 2012), afin de mesurer l'activité de la PLD de venin d'araignée (Cf. 1.4.2.2.) et de visualiser les effets de son activité hydrolytique à l'interface de GUV (Cf.1.2.3.2.), par microscopie confocale. C'est également le cas de la 4-(2-pyren-1-yl-vinyl) pyridine, synthétisée par Singh et collègues (Singh *et al.*, 2003), qui est, quant à elle, sensible à la charge négative des phospholipides, tels que le PA, et des détergents, tels que le SDS.

De même, certains dérivés de la 3-hydroxyflavone (3HF), tels que la 4*p*-diméthylamino-3-hydroxyflavone, sont sensibles au potentiel électrostatique des membranes (Duportail *et al.*, 2001). L'une des propriétés les plus remarquables de la 3HF réside dans sa capacité à réémettre à deux longueurs d'onde différentes, lors du phénomène de fluorescence. En effet, lors de son excitation, la 3HF subit une première isomérisation, qui conduit à l'apparition d'une forme mésomérique excitée (3HF^{*}). Néanmoins, la 3HF^{*} est elle-même capable de subir une seconde isomérisation, *via* un transfert intramoléculaire de proton conduisant, cette fois-ci, à l'apparition d'une forme tautomérique excitée (3HF^{**}). Ainsi, lors du phénomène de fluorescence, les deux formes 3HF^{*} et 3HF^{**} se déséxcitent en même temps à deux longueurs d'onde différentes (Klymchenko *et al.*, 2003). Cette propriété a notamment été mise à contribution par Shynkar et collègues, qui ont rapporté l'utilisation de la sonde F2N12S pour suivre le phénomène d'apoptose (Shynkar *et al.*, 2007). En effet, cette sonde, qui dérive de la 3HF, se localise dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Dans ce cas, le ratio des intensités de fluorescence émises par les formes 3HF^{*} et 3HF^{**} permet d'évaluer la présence de PS à la surface des cellules (Cf. 1.2.2.4.), *via* le changement de potentiel électrostatique de la membrane.

Ainsi, l'utilisation de sondes fluorescentes, sensibles à l'environnement, apparaît être un moyen adéquat pour le dosage du PA généré par PLD. Néanmoins, ces molécules étant également capables de détecter d'autres phospholipides chargés négativement, tels que la PS et le PG, la question relative à la spécificité de détection reste au cœur du problème. C'est pourquoi, l'utilisation de sondes fluorescentes capables de détecter les groupements phosphates, apparaît beaucoup plus adaptée.

1.8.5.3. Détection des groupements phosphates

Parmi les sondes fluorescentes disponibles, la 8-hydroxyquinoléine (8HQ) et ses dérivés ont été rapportés comme étant capable de détecter les groupements phosphates, en présence d'ions métalliques, tels que le Mg²⁺ et le Ca²⁺ (métaux alcalino-terreux). En effet, cette propriété a été mise en évidence par Shults et collègues (Shults *et al.*, 2003), qui sont parvenus à utiliser un dérivé de 8HQ, dans le but de mesurer les activités kinase, *in vitro*.

Ainsi, les auteurs ont rapporté la synthèse d'un peptide modulaire, incorporant un dérivé de la 8HQ, associé à un motif de reconnaissance pour les kinases, et suivi d'une tyrosine, d'une sérine ou d'une phénylalanine, substrats pour la réaction de phosphorylation. Ainsi, comme le décrit la figure 52A, suite à la réaction de phosphorylation, catalysée par la kinase, le dérivé de la 8HQ est capable de former un complexe fluorescent avec le groupement phosphate, en présence Mg²⁺, *via* un phénomène d'amplification de fluorescence par chélation (*CHEF – CHElation Enhanced Fluorescence*).

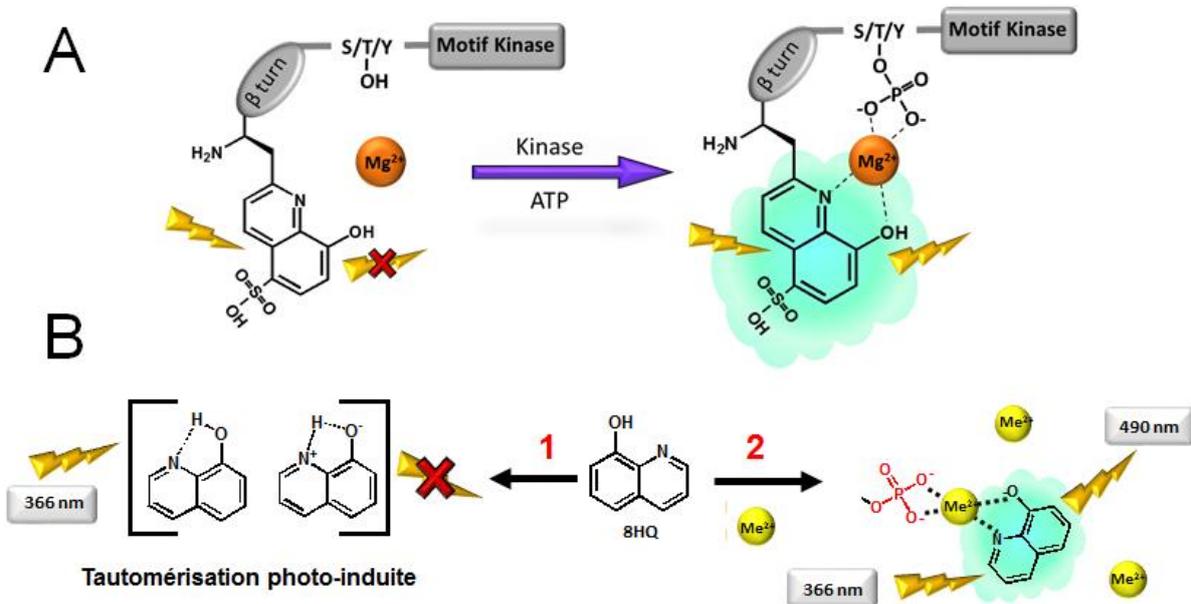


Figure 52 : (A) Représentation schématique du peptide synthétique développé par Shults et collègues (Shults *et al.*, 2003) qui permet de détecter le groupement phosphate par un dérivé de la 8HQ, en présence de Mg^{2+} , et suite à la phosphorylation par une kinase. (B) Représentation du phénomène de tautomérisation photo-induite (1) subit par la 8HQ, en l'absence de métal, et du phénomène d'amplification de fluorescence par chélation (2), en présence d'ions métalliques (Me^{2+}) (Bardez *et al.*, 1997).

En effet, la 8HQ est une molécule qui présente la propriété de devenir fluorescente, lors de sa chélation d'un métal. Ainsi, en l'absence d'ion métallique, la 8HQ subit une tautomérisation photo-induite (Figure 52B-1), qui correspond à un transfert intramolécule de proton, à partir de son groupement phénol vers l'azote de son cycle pyridine. Ce phénomène entraîne, ainsi, une désexcitation de manière non radiative de la 8HQ (phénomène de conversion interne, Cf. 1.8.5.1.), et par conséquent, à une perte de fluorescence (Bardez *et al.*, 1997). *A contrario*, la chélation d'un ion métallique par la 8HQ (Figure 52B-2), induit une déprotonation du groupement phénol, qui empêche ainsi l'apparition du phénomène de tautomérisation photo-induite. Dans ce cas, la 8HQ est alors capable de se désexciter sous forme de fluorescence (Bardez *et al.*, 1997).

Ainsi, grâce à sa propriété de reconnaissance des groupements phosphate associée à sa propriété d'amplification de fluorescence, la 8HQ et ses dérivés apparaissent être une piste de recherche prometteuse pour le développement d'une méthode de dosage du PA généré par la PLD.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel de biologie moléculaire

2.1.1.1. ADN_s matrices

L'ADN complémentaire (ADN_c) de l'ARN messager de la PLD α 1 d'*A. thaliana* (AtPLD α) (Zheng *et al.*, 2000) a été fourni par le Pr. X. Wang (Université du Missouri, St. Louis). Il est à noter que cet ADN_c diffère de quelques résidus par rapport à la séquence modèle (AT3G15730) proposée par la base de données TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). L'ADN_c de la PLD β 1 (AtPLD β) (pdx82318) a, quant à lui, été obtenu *via* la division plante du RIKEN (institut de recherche scientifique Japonais) et correspond à la séquence modèle (AT2G42010) proposée par TAIR.

2.1.1.2. Vecteurs d'expression

➤ **pET28b(+)**

Le vecteur utilisé pour les expressions bactériennes des AtPLD α et - β ainsi que de leur domaine C2 est le plasmide pET28b(+) de Novagen (Figure 53). Il s'agit d'un vecteur d'expression inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) contenant différentes séquences nucléiques qui permettent une expression optimale de la protéine d'intérêt. De prime abord, ce vecteur présente le promoteur T7 (Figure 53) qui n'est reconnu que par l'ARN polymérase du bactériophage T7, absente des souches sauvages d'*E. coli*.

Ainsi, seule les souches génétiquement modifiées par l'ajout du gène codant cette polymérase, telles que la souche BL21, sont capables d'exprimer la protéine cible. Bien que cette stratégie puisse paraître contraignante, elle présente en réalité plusieurs avantages. Tout d'abord, l'utilisation de cette polymérase permet d'obtenir un taux d'expression protéique beaucoup plus important qu'avec les polymérases endogènes, le promoteur T7 étant un promoteur dit « fort ». Par ailleurs, le fait d'utiliser une polymérase exogène permet d'éviter une transcription et une expression non désirées de la protéine d'intérêt lors des manipulations d'amplification du plasmide.

De surcroît, ce vecteur présente deux gènes de l'opéron lactose (*lacI* et *lacO*) qui permettent de contrôler l'expression de la protéine d'intérêt par induction à l'IPTG (Figure 53). En effet, grâce au gène *lacI*, ce vecteur exprime de manière constitutive le répresseur de l'opérateur lac (*lacO*) situé en aval du promoteur T7. Ceci a pour conséquence de bloquer la transcription du gène d'intérêt, le répresseur venant se fixer à l'opérateur.

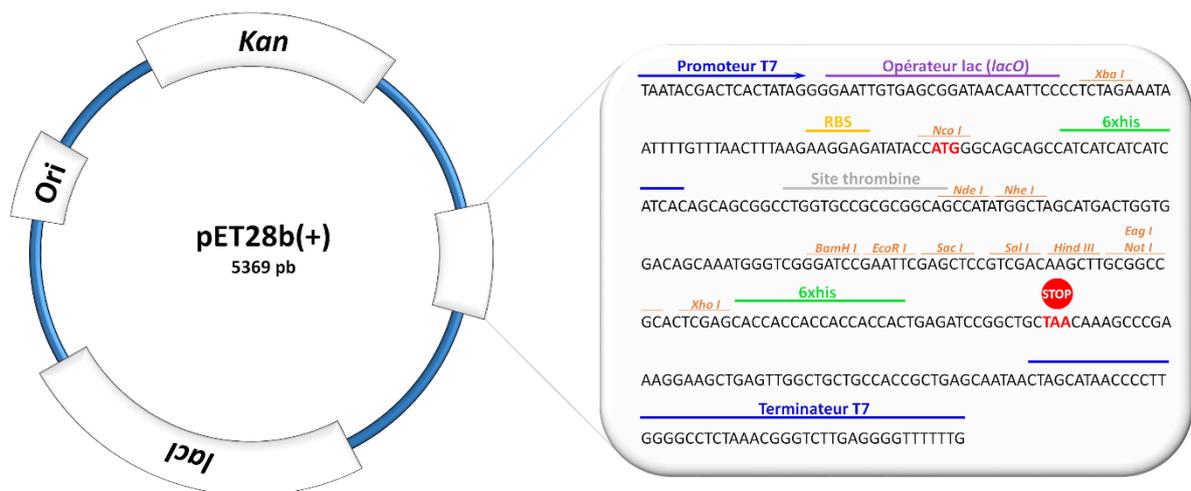


Figure 53 : Représentation schématique du vecteur pET28b et séquence de sa région d'expression, contenant le site multiple de clonage (MCS).

Cependant, cette répression peut être levée lors de l'addition de lactose ou d'IPTG, un analogue non hydrolysable par les enzymes bactériennes, qui va se fixer au répresseur et ainsi libérer l'opérateur, permettant *in fine* la transcription du gène cible. Ainsi, grâce à cette configuration, l'expression de la protéine d'intérêt est hautement contrôlée par le manipulateur *via* le choix de la cellule hôte et de l'addition d'inducteur. Ceci permet notamment d'éviter toute expression basale de la protéine cible qui peut être toxique pour le système hôte (cas notamment de l'expression de toxines).

Par ailleurs, en aval du promoteur T7 et de l'opérateur *lacO*, ce vecteur présente la séquence Shine-Dalgarno ou site de fixation au ribosome (RBS), qui permet la fixation du ribosome au plasmide (Figure 53). Cette séquence est suivie par le site multiple de clonage (MCS) qui offre la possibilité de choisir les sites de restriction les plus adaptés au clonage (notamment dans le cas de sites de restriction internes au gène d'intérêt) ainsi que la possibilité de fusionner une étiquette poly-histidine (6xHis) en position N- ou C-terminale de la protéine d'intérêt (Figure 53). De plus, le vecteur pET28b offre la possibilité de retirer l'étiquette 6xHis lorsqu'elle est présente en position N-terminale, grâce à la présence d'un site de clivage par la thrombine (protéase). Enfin, le vecteur pET28b possède une origine de répllication bactérienne *Ori* (Figure 53) qui lui permet de maintenir approximativement 40 copies de plasmide par cellule, ainsi que le gène *Kan* qui permet l'expression de manière constitutive d'une protéine de résistance à la kanamycine. Ce gène confère ainsi une résistance à cet antibiotique et permet de sélectionner les bactéries ayant incorporé le plasmide.

➤ **pGAPZB**

Le plasmide pGAPZB (Figure 54) est un vecteur conçu pour l'expression de protéines recombinantes dans *P. pastoris* (système levure). Ce plasmide présente un gène de résistance à la zéocine, un antibiotique qui agit à la fois sur les bactéries et sur les levures. À l'inverse du pET28b, ce vecteur présente une origine de réplication bactérienne *pUC* (Figure 54), permettant d'obtenir plusieurs centaines de copies par cellule et ainsi, une quantité importante de plasmide lors des Midi-préparations.

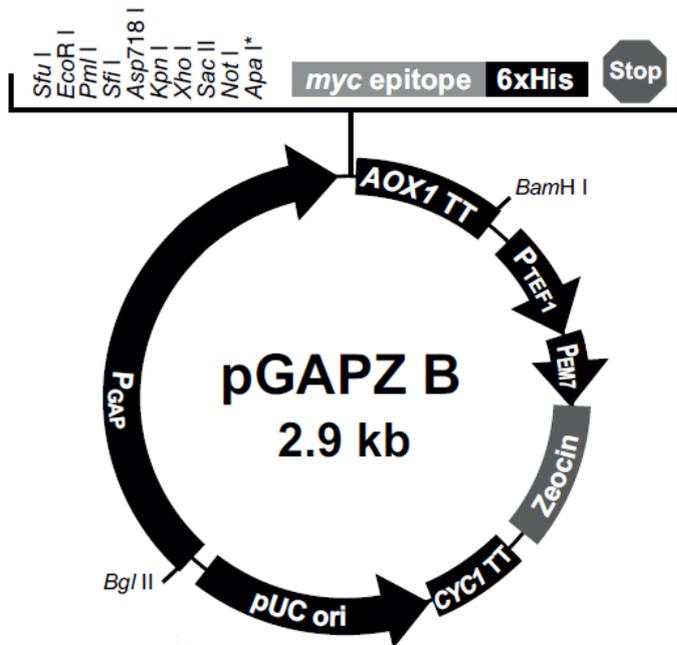


Figure 54 : Représentation schématique du vecteur pGAPZB, utilisé pour l'expression dans *P. pastoris*, ainsi que de sa cassette de clonage. Ce vecteur présente notamment le promoteur P_{GAP}, l'origine de réplication bactérienne pUC ainsi que le terminateur AOX1. La cassette de clonage contient les sites de restriction ainsi que l'épitope *myc*, l'étiquette 6xHis et le codon stop.

Par ailleurs, le MCS de ce plasmide fait suite au promoteur de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (P_{GAP}) qui, à l'instar du promoteur T7 du pET28b, est un promoteur « fort » (Figure 54). Cependant, ce promoteur n'est pas sous la dépendance d'un opérateur comme le pET28b et ne permet donc pas de contrôler l'induction de la synthèse protéique. La transcription du gène d'intérêt s'effectue par conséquent de manière constitutive. Ce MCS est présent entre le P_{GAP} et la région de terminaison de transcription du gène AOX1 (terminateur du gène codant pour l'alcool oxydase 1) et offre la possibilité de fusionner la protéine d'intérêt à l'épitope *myc* ainsi qu'à une étiquette 6xHis (Figure 54).

2.1.1.3. Enzymes utilisées pour les clonages

- La KOD ADN polymérase de *Thermococcus kodakaraensis* (Novagen) est utilisée pour les manipulations de clonage. En effet, il s'agit d'une polymérase thermostable qui possède l'un des plus hauts taux d'élongation, parmi les polymérases disponibles, capable d'incorporer jusqu'à 140 nucléotides par seconde. Elle est, par ailleurs, de très grande fidélité grâce à son activité 3'→5' exonucléasique qui permet la correction des

mésappariements. Son tampon concentré 10 fois est composé de Tris-HCl 1,2 M, de KCl 100 mM, de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60 mM, et de Triton X-100 1% (v/v) (pH 8,0).

- La Taq polymérase de *Thermus aquaticus* (Euromedex) est principalement utilisée pour cribler la présence des gènes d'intérêt après les expériences de clonage. En effet, il s'agit d'une polymérase de faible fidélité qui est dépourvue d'activité exonucléasique. Son tampon concentré 10 fois est composé de 0,8 M de Tris-HCl, de 0,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 25 mM de MgCl_2 (pH 8).

- La phosphatase Antarctique (New England BioLabs) permet d'hydrolyser l'extrémité 5' phosphate du vecteur digéré. Ceci empêche la re-ligation du vecteur sur lui-même et diminue ainsi le bruit de fond lors des manipulations de ligation. Le tampon utilisé contient 50 mM de Bis-Tris-Propane-HCl, 1 mM de MgCl_2 et 0,1 mM de ZnCl_2 (pH 6,0).

- La T4 ADN ligase (Euromedex) catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 5' et 3' de l'ADN. Le tampon concentré 10 fois est composé de 400 mM de Tris-HCl, 100 mM de MgCl_2 , 5 mM d'ATP et de 100 mM de DTT (pH 7,6).

- La T4 ADN polymérase (Euromedex), quant à elle, catalyse la synthèse des acides nucléiques dans le sens 5' → 3' en utilisant un ADN matrice mais est aussi pourvue d'une activité 3' → 5' exonucléasique. Ainsi cette enzyme est utilisée pour la synthèse d'extrémités franches à partir d'extrémités cohésives. Le tampon concentré 10 fois est composé de 100 mM Tris-HCl, 500 mM de NaCl, 100 mM de MgCl_2 et 100 µg/ml albumine de sérum bovin (BSA) (pH 7,9).

2.1.1.4. Amorces utilisées pour les clonages

Les amorces utilisées (Tableau 4) pour l'amplification des séquences nucléotidiques par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été synthétisées par la société Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne). Cette même société a effectué les séquençages nucléiques des plasmides recombinés par l'utilisation de la méthode des didésoxynucléotides.

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant pour les PLDs et leurs différents domaines. Les codons initiateurs sont en gras, les bases mutées par rapport aux séquences authentiques sont surlignées en gris et les sites de restriction soulignés.

Nom	Séquence des amorces	Orientation	Site de restriction
pET28b			
085	5'TGCACCATGGAGATGACACTGTTTGGTAAAG3'	Sens	<i>NcoI</i>
086	5'TGCTGCGGCCGCAATGGTTAG ATTCTCTTGTATG3	Anti-sens	<i>NotI</i>
088	5'TGCACCATGGACAAACTCAGCGTTTATCATC3'	Sens	<i>NcoI</i>
089	5' TGCTGCGGCCGCCATAGGAGTATACTGAATCG 3'	Anti-sens	<i>NotI</i>
095	5'TGCAACATGTCGCAGCATCTGTTGCAC3'	Sens	<i>PciI</i>
096	5'TGCTGCGGCCGCGGTTGTAAGGATTGGAGG3'	Anti-sens	<i>NotI</i>
097	5'TGCTGCGGCCGCTTAGGTTGTAAGGATTGGAG3'	Anti-sens	<i>NotI</i>
098	5'TGCAACATGTTAGATCGTAACTGGAACA3'	Sens	<i>PciI</i>
099	5'TGCTGCGGCCGCCTCAACATGAAATATTGAAGC3'	Anti-sens	<i>NotI</i>
pGAPZB			
103	5'TCAGTCGACAAAAGAATGGCGCAGCATCTGTTGC3'	Sens	<i>Sall</i>
214	5'TGCACCATGGCAAATGTAGAAGAGACG3'	Sens	<i>NcoI</i>
215	5'TGCACCATGGTTGGAAGATTGCCAGG3'	Sens	<i>NcoI</i>

Pour vérifier chaque construction, une PCR a été effectuée avec les amorces complémentaires du promoteur T7 (amorce 021) ou du promoteur P_{GAP}, en amont du codon initiateur ainsi que des domaines C2 (Tableau 5)

Tableau 5 : Couples d'amorces utilisés pour le criblage des clones recombinants par PCR avec la Taq polymérase. 021 : promoteur T7 ; 029 : promoteur P_{GAP} ; 101 : domaine C2 de l'AtPLD α ; 093 : domaine C2 de l'AtPLD β ; pb : paires de bases.

Nom de la construction	Couple d'amorces utilisées	Taille attendue (pb)
pET28b-AtC2PLD α	021/101	224 pb
pET28b-AtPLD α		
pBluescript-AtPLD α		
pGAPZB-AtPLD α	029/101	235 pb
pET28b-AtC2PLD β	021/093	284 pb
pET28b-AtPLD β		
pBluescript-AtPLD β		

2.1.1.5. Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction *NcoI*, *NotI*, *PciI*, *Sall*, *XbaI*, *XhoI*, *EcoRI* et *KpnI* utilisées pour les clonages, pour la vérification de l'insertion des amplicons ainsi que pour la modification du pGAPZB ont été fournies par *New England Biolabs* et / ou par *Jena Bioscience*. Les enzymes utilisées pour les vérifications, par restriction, de l'insertion des

amplicons dans le pET28b ainsi que les tailles attendues des fragments résultants sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Enzymes utilisées pour les vérifications par restriction et tailles attendues des fragments résultants.

Construction	Enzymes de restriction	Taille attendue (pb)	
		Insert	Vecteur
pET28b-AtC2 α	XbaI / XhoI	505 pb	5 188 pb
pET28b-AtPLD α	EcoRI	1 769 pb	5 899 pb
pET28b-AtC2 β	XbaI / XhoI	539 pb	5 188 pb
pET28b-AtPLD β	XbaI / XhoI	2 534 pb	5 188 pb

2.1.1.6. Kits de purification des acides nucléiques

Le kit QIAquick (QIAGEN) est utilisé pour la purification de fragments d'ADN d'une taille comprise entre 100 et 10 000 pb, tels que les amplicons de PCR. Il est composé d'une micro-colonne contenant une membrane de silice sur laquelle l'ADN peut s'adsorber (Cf. 2.2.2.3.). Le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) est utilisé pour la purification de plasmides par midi-préparation (Cf. 2.2.2.6.).

2.1.1.7. Souches

➤ **One Shot® TOP10**

La souche *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) est utilisée pour les manipulations de clonage et d'amplification de plasmide. En effet, celle-ci est génétiquement optimisée pour la réplication des plasmides et possède le génome suivant : F-, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80/lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *nupG*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galJ*, *galK*, *rpsL(Str^R)*, *endA1*. La mutation du gène *nupG* permet l'expression constitutive des gènes de synthèse des désoxyribonucléotides. Par ailleurs, la mutation des gènes *recA1* et *endA1* empêche la recombinaison de l'ADN cloné ainsi que sa digestion par l'endonucléase I bactérienne. De plus, cette souche porte plusieurs mutations sur des gènes impliqués dans le métabolisme et le clivage des ADN méthylés. Enfin, les bactéries TOP10 ne possédant pas l'ARN polymérase du bactériophage T7, cette souche permet la réplication du plasmide sans exprimer la protéine d'intérêt. Ceci évite tout problème d'instabilité du plasmide et toute perturbation de croissance bactérienne.

➤ **BL21-CodonPlus® (DE3)-RIPL**

La souche *Escherichia coli* BL21 (DE3)-RIPL (Stratagene) est utilisée pour l'expression de protéines recombinantes avec des plasmides de même type que le pET28b. En effet, cette souche exprime la polymérase du bactériophage T7 dont le promoteur est utilisé pour la transcription des gènes clonés dans le pET28b. Elle possède le génome

suivant : $F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r gal \lambda(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]$. Le plasmide pRIPL porte le gène de résistance au chloramphénicol. Il code les ARN de transfert des codons rares chez *Escherichia coli* mais fréquents chez les végétaux tels qu'*A. thaliana*. Il s'agit de : *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA), *proL* (CCC) et *leuW* (CUA). Il est à noter que l'ARNt du codon CGA, rare chez *E. coli* mais fréquent chez *A. thaliana*, n'est pas codé par ce plasmide.

➤ **Souche X-33 de *Pichia pastoris***

X-33 est la souche sauvage de *P. pastoris*, c'est-à-dire, qui ne comporte pas de modification dans son génome. Par ailleurs, cette souche est sensible à la zéocine, dont le gène de résistance peut être apporté par un plasmide de type pGAPZ.

2.1.1.8. Milieux de culture

Le milieu LB, ou *Lysogeny broth*, est utilisé pour la culture d'*E. coli*. Pour un litre d'eau, ce milieu est composé de 10 g de bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levures et 10 g de NaCl. Le milieu solide est, quant à lui, additionné de 15 g d'agar par litre. Le milieu YPG (*Yeast-Peptone-Glucose*) contient 10 g d'extrait autolytique de levures, 10 g de peptone et 20 g de glucose pour 1 litre d'eau. Les milieux solides correspondant sont supplémentés de 20 g d'agar par litre. Ces milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave pendant 15 min à 120°C.

2.1.2. Matériel de purification des protéines

2.1.2.1. Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés

Les purifications des protéines fusionnées à une étiquette 6xHis sont purifiées en utilisant les résines Protino® Ni-IDA et Ni-TED de Macherey-Nagel. Les groupements IDA (IminoDiacetic Acid) et TED (Tris(carboxyméthyl)Éthylène Diamine) sont capables de chélater des ions métalliques, tels que le Ni^{2+} , afin de fixer l'étiquette 6xHis. La résine Ni-IDA présente 3 sites de fixations par étiquette 6xHis contre 1 seul site pour la résine Ni-TED. Il en résulte que la résine Ni-IDA présente une excellente efficacité de fixation tandis que la résine Ni-TED présente une grande spécificité.

2.1.2.2. Chromatographie hydrophobe

La purification de la PLD est effectuée par chromatographie hydrophobe à l'aide d'une résine d'Octyl-Sépharose CL-4B. Cette résine est composée de billes d'agarose sur lesquelles sont covalamment fixées des chaînes à 8 atomes de carbones.

2.1.2.2. Chromatographie sur couche mince

Les lipides et les produits des réactions catalysées par les PLDs étudiées ont été analysés par Chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques de CCM utilisées (silica gel 60 F₂₅₄) sont recouvertes d'une couche de 0,2 mm de silice qui contient un fluorophore visualisable sous excitation UV (250 nm). Celles-ci proviennent de Merck.

2.1.3. Protéines et enzymes

La PLD de chou (*Brassica oleracea* - BoPLD), la PLD d'arachide (*Arachis hypogaea* - AhPLD), la PLD de *Streptomyces chromofuscus* (ScPLD), la PLC de *Clostridium perfringens*, la PLA₁ de *Thermomyces lanuginosus* et la PLA₂ pancréatique porcine A₂ ont été achetées auprès de Sigma-Aldrich-Fluka Chimie (St-Quentin-Fallavier, France). Toutes les concentrations protéiques ont été déterminées en utilisant la procédure de Bradford (Bradford, 1976), avec le kit *Bio-Rad Dye Reagent* de chez Bio-Rad, et de l'albumine de sérum bovin pour la gamme étalon.

2.1.4. Lipides et détergents

La 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC), la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE), le 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-(1'-*rac*-glycérol) (POPG), la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine (POPS), le 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphate (POPA) et le 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(5-diméthylamino-1-naphthalène-sulfonyl) (dansyl-PE) proviennent de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA). Le phosphatidyléthanol (PEtOH) provient de Larodan AB (Malmö, Suède) et le phosphatidylbutanol (PBut) provient d'Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York, USA). Le Triton X-100, le taurodeoxycholate de sodium (NaTDC), le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), le chlorure de cetylpyridinium (CPC) ont été fournis par Sigma-Aldrich-Fluka Chimie (St-Quentin-Fallavier, France) et le SDS par Euromedex (Souffelweyersheim, France).

2.1.5. Appareillages

Les transformations ont été effectuées avec un électroporateur MicroPulser™ de chez Bio-Rad. Le spectrophotomètre UV-visible utilisé est un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Les cinétiques enzymatiques ont été suivies en utilisant un lecteur de microplaques Tecan Infinite M200 (UV-visible-fluorescence) et les purifications de protéines ont été effectuées sur un appareil de chromatographie Äkta prime (GE Healthcare Life Science).

2.2. Méthodes

2.2.1. Modification du pGAPZB

Le pGAPZB a tout d'abord été modifié, en excisant une partie des sites de restrictions contenus dans le MCS. En effet, afin de maximiser les chances d'expression de l'AtPLD α , son codon initiateur a été rapproché du promoteur P_{GAP}, de manière similaire à la VuPLD (Ben Ali *et al.*, 2007), clonée entre les sites *EcoRI* et *XbaI*. Bien que le clonage de l'AtPLD α eût été simplifié par l'utilisation des sites *EcoRI* et *XbaI*, ceci n'a, néanmoins, pas été possible, puisque cette PLD présente des sites *EcoRI* internes. Ainsi, afin d'obtenir une telle modification, le pGAPZB natif a, tout d'abord, été digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *KpnI* et purifié, permettant ainsi d'exciser la partie non désirée du MCS (Figure 55). Des fragments francs ont ensuite été générés en utilisant la T4 ADN polymérase, qui présente une activité 5'→3' polymérase, permettant de reconstruire le site *EcoRI*, mais également une activité 3'→5' exonucléase, qui aboutit à la destruction du site *KpnI* (Figure 55). Finalement, le pGAPZB modifié a été reliqué sur lui-même avec la T4 ADN ligase, afin d'obtenir le site *XhoI* en aval du site *EcoRI*, le rapprochant ainsi du promoteur GAP (Figure 55).

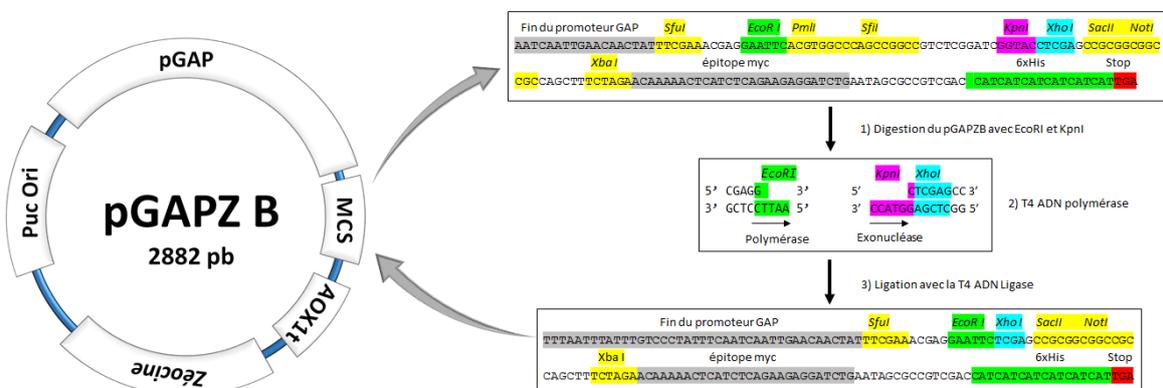


Figure 55 : Étapes de la stratégie utilisée pour modifier le MCS du pGAPZB. Les sites de restriction ainsi que la fin du promoteur, l'épitope *myc*, l'étiquette 6xHis ainsi que le codon stop sont surlignés.

2.2.2. Clonages des ADNc

2.2.2.1. Amplification par PCR

Pour chacune des amplifications, 5 ng d'ADN matrice sont mélangés avec 0,2 mM de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), 1 mM de MgCl₂, 0,4 μM de chaque amorce (voir Tableau 4) et 1 unité de KOD polymérase pour un volume final de 25 μL. Afin d'amplifier les séquences d'intérêt, trente cycles de PCR sont effectués. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 98°C durant 15 s, suivie d'une étape unique d'hybridation et d'extension à 68°C pendant 15 s ou 30 s selon la taille du fragment à amplifier.

2.2.2.2. Analyse des amplicons

Les amplicons obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Pour cela, l'agarose est dissous dans du tampon Tris-acétate 40 mM (pH 8), EDTA 1 mM (TAE) et additionné de 1 μg/mL de bromure d'éthidium. Le pourcentage d'agarose (0,5 à 1,5 %, p/v) ajouté dépend de la taille des fragments d'ADN à séparer. Il est généralement compris entre 0,5 % (1 000 – 30 000 pb) et 1,5 % (200 – 3 000 pb). Après polymérisation du gel, les échantillons à analyser sont mélangés à 0,2 volume de tampon de charge avant dépôt sur gel (bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol FF 0,25 % (p/v), glycérol 30 %). La migration s'effectue dans le tampon de migration TAE à 100 V durant 20 min. Les fragments d'ADN sont révélés sous éclairage ultraviolet (UV) grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé entre les bases nucléiques. La taille des fragments d'ADN séparés sur le gel est estimée grâce à un marqueur de taille (1 kpb de chez *Invitrogen*TM), migrant en parallèle des échantillons sur le gel.

2.2.2.3. Purification des amplicons

Les inserts sont purifiés à l'aide du kit QIAquick de QIAGEN. La purification s'effectue en trois étapes. L'ADN est tout d'abord déposé dans la micro-colonne et centrifugé. L'adsorption de l'ADN sur la membrane dépend du pH (voisin de 7) et d'une forte concentration en sels chaotropiques tels que le chlorhydrate de guanidine. La membrane de silice est ensuite lavée avec un tampon contenant du NaCl et de l'éthanol. Ceci permet à l'ADN de rester fixé sur la membrane et d'éliminer le premier tampon ainsi que les contaminants. L'élution est effectuée avec du tampon Tris-HCl (pH 8,5) ou de l'eau. L'absence de sels dans ces solutions permet de décrocher l'ADN de la membrane de silice.

La quantité d'ADN purifié est finalement estimée en mesurant l'absorbance à 260 nm par un spectrophotomètre de type Nanodrop.

2.2.2.4. Ligation des amplicons dans le plasmide

Pour l'insertion des amplicons dans le plasmide, 500 ng d'inserts purifiés et 2 µg de vecteur sont digérés durant 2 h à 37°C avec les enzymes de restriction adéquates. Les réactions sont effectuées dans un volume final de 200 µL tamponnés pour le vecteur et 100 µL pour les inserts. Le vecteur digéré est ensuite incubé durant 20 min à 37°C en présence de phosphatase Antarctique, afin de réduire les phénomènes de re-ligation du plasmide sur lui-même. Après une nouvelle purification des fragments d'ADN à l'aide du kit QIAquick, les inserts sont ligués avec 100 ng de vecteur, pour un rapport molaire vecteur : insert de 1:0, 1:1, 1:3 ou 1:5 pendant 1 h à température ambiante ou sur la nuit à 16°C. La ligation est effectuée en présence de 1 U de T4 DNA ligase dans un volume final de 20 µL de tampon.

2.2.2.5. Transformation des bactéries TOP10

Les bactéries sont rendues électrocompétentes par quatre lavages successifs à l'eau glacée et conservées à -80°C dans 10% de glycérol. Pour l'électroporation, 40 µL de bactéries sont soumis à un choc électrique de 1,5 kV pendant 5 ms en présence de 10 ng d'ADN, dans une cuvette de 0,2 cm de largeur. Ce choc fragilise la membrane bactérienne et permet l'entrée de l'ADN par les pores formés. Après l'ajout de 200 µL de milieu LB sans antibiotique, les bactéries sont incubées pendant 30 min à 37°C sous agitation. Enfin, 50 µL de chaque transformation sont étalés sur boîtes de LB-agar supplémentées de l'antibiotique adéquat (0,1 mg/mL, concentration finale).

Les clones transformés sont criblés par PCR afin de sélectionner les bactéries possédant le gène correctement cloné dans le plasmide. La PCR est effectuée, comme précédemment, directement sur 0,2 µL de culture cellulaire avec la Taq polymérase et en utilisant les amorces adéquates. Les amplifications sont effectuées avec trente cycles de PCR, après une première étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 95°C durant 30 s, suivie d'une étape d'hybridation à 40°C pendant 30 s et d'une étape d'extension à 72°C durant 1 min et 30 s. Finalement, une dernière étape d'extension à 72°C pendant 3 min est effectuée. Afin de vérifier les amplifications, les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose et analysés.

2.2.2.6. Midi-préparations et vérification des constructions

Afin d'amplifier et de purifier les plasmides portant les gènes d'intérêt, les clones positifs par PCR sont cultivés dans 200 mL de LB à 37°C durant une nuit. Les bactéries sont ensuite sédimentées par centrifugation à 3 000 x g et l'ADN plasmidique est finalement extrait par midi-préparation à l'aide du kit NucleoBond de Macherey-Nagel. Pour cela, le culot bactérien est resuspendu en présence de ribonucléase A, qui hydrolyse les ARN messagers, puis les bactéries sont lysées avec du SDS en conditions alcalines (pH 13). Cette étape permet, en outre, de dénaturer les ADN génomiques et plasmidiques en rompant les liaisons hydrogènes entre les bases appariées.

Le lysat bactérien est ensuite rapidement neutralisé par l'ajout d'acide acétique, précipitant ainsi l'ADN génomique tandis que l'ADN plasmidique reste soluble. En effet, bien que la neutralisation de la solution permette aux nucléotides de reformer des liaisons hydrogène, cette étape est trop rapide pour permettre aux brins d'ADN génomique de se ré-apparier efficacement, aboutissant *in fine* à sa précipitation. La solution est ensuite clarifiée, puis chargée sur une colonne échangeuse d'anions. Celle-ci est composée de billes de silice fonctionnalisées avec du méthyl-amino-éthanol. Ainsi, à pH acide, ces groupements sont chargés positivement et permettent la fixation de l'ADN *via* les charges négatives des groupements phosphates. Après lavage de la colonne, l'ADN plasmidique est élué et précipité à l'isopropanol. L'éluion s'effectue avec un tampon contenant une force ionique comprise entre 1,5 M et 2 M de KCl et à pH 9.

Afin de concentrer le plasmide élué, l'ADN précipité est retenu sur un filtre de 0,22 µm et lavé avec de l'éthanol à 70%. La membrane du filtre est ensuite séchée et le plasmide est finalement élué avec de l'eau. Après purification, les constructions sont vérifiées par restriction durant 1 h à 30°C ou 37°C, avec les enzymes adéquates dans un volume final de 15 µL. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, et les constructions validées sont séquencées (Eurofins MWG Operon).

2.2.3. Expression hétérologue des protéines recombinantes

2.2.3.1. Expression en système bactérien

➤ **Transformations et tests d'expression**

L'expression des protéines recombinantes est effectuée avec le vecteur pET28b (Cf. 2.1.1.2.) en utilisant les bactéries BL21 (Cf. 2.1.1.7.), qui expriment la polymérase du bactériophage T7. Pour cela, les bactéries sont transformées par électroporation comme précédemment décrit (Cf. 2.2.2.5.). Après transformation des bactéries et sélection sur boîtes de LB agar, supplémentées de kanamycine et de chloramphénicol (respectivement à 0,1 mg/mL et 0,05 mg/mL, concentration finale), l'expression des protéines d'intérêt est criblée. Pour cela, plusieurs colonies isolées sont mises en culture individuellement durant la nuit à 37°C sous agitation dans 1 mL de milieu LB en présence des antibiotiques adéquats à 0,1 mg/mL (concentration finale). Ensuite, 150 µL de chaque pré-culture sont inoculés dans 3 mL de milieu LB et les bactéries sont cultivées jusqu'à atteindre une DO à 600 nm (DO_{600}) comprise entre 0,6 et 1. L'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM final) et les bactéries sont cultivées durant 4 h à 37°C ou toute la nuit à 20°C sous agitation.

➤ **Analyse des extraits cellulaires**

Afin d'examiner l'expression des protéines d'intérêt, le profil protéique des bactéries doit être analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) (Cf. 2.2.5.2.). Pour cela, un aliquot de chaque culture cellulaire, équivalent à 100 µL d'une DO_{600} de 1, est centrifugé à 2 000 x g afin de sédimenter les bactéries. Les culots bactériens sont ensuite resuspendus dans 15 µL de tampon de Laemmli (Cf. 2.2.5.2.) et incubés à 95°C pendant 5 min afin de lyser les cellules et de dénaturer les protéines. Enfin, les échantillons sont séparés par SDS-PAGE (Cf. 2.2.5.2.).

➤ **Production des protéines recombinantes**

Il est nécessaire d'effectuer des cultures cellulaires à plus grande échelle, afin de pouvoir obtenir les protéines d'intérêt en quantités suffisantes pour les purifications. Pour cela, une colonie isolée est mise en pré-culture durant la nuit à 37°C sous agitation dans 10 mL de milieu LB en présence des antibiotiques adéquats à 0,1 mg/mL (concentration finale). Cette pré-culture est ensuite inoculée dans 1 L de milieu LB et, comme précédemment, les bactéries sont cultivées jusqu'à atteindre une DO_{600} comprise entre 0,6 et 1. À l'instar des tests d'expression, la production des protéines est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG (concentration finale) et les bactéries sont cultivées durant 4 h à 37°C ou toute la nuit à 20°C sous agitation.

➤ **Lyse cellulaire**

Après induction de l'expression des protéines, les bactéries sont sédimentées et re-suspendues avec 2 à 5 mL de tampon de lyse, composé de NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM (pH 8), par gramme de culot. Les bactéries sont ensuite incubées durant 1 h à 4°C, en présence de 1 mg/mL de lysozyme, et lysées par des sonication de 3 fois 3 min (cycle 0,5 et amplitude de 75 %) avec un intervalle de 1 min entre chaque cycle, à 4°C. Le lysozyme est une glycosidase qui digère les parois bactériennes en catalysant l'hydrolyse des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ glucosidique entre la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétyl-muramique du peptidoglycane. Enfin, le lysat bactérien est centrifugé à 10 000 x g pendant 15 min et le surnageant est séparé du matériel insoluble sédimenté. Dans le cas de la production de protéines solubles, le surnageant obtenu peut être directement utilisé pour les manipulations de purification. Néanmoins, lors de la production de protéines recombinantes en système bactérien, il est fréquent que celles-ci s'agrègent entre elles durant l'étape d'induction. Ceci aboutit à la formation de corps d'inclusions, insolubles dans le tampon de lyse, et qui sédimentent lors de l'étape de centrifugation.

➤ **Solubilisation des corps d'inclusion**

Dans le cas de l'expression protéique sous forme de corps d'inclusion, il est nécessaire de re-suspendre le culot obtenu avec un tampon contenant une concentration importante d'agents chaotropiques, tels que l'urée (8 M). Ces agents ont la propriété de déstabiliser les liaisons hydrogène inter- et intra-protéiques, permettant de solubiliser les protéines d'intérêt mais aboutissant, néanmoins, à leur dénaturation. Ainsi, pour les protéines exprimées dans les corps d'inclusion, la concentration minimale d'urée nécessaire à leur solubilisation doit être criblée. Pour cela, les culots équivalant à 50 μL de lysat bactérien sont re-suspendus avec du tampon de lyse contenant une concentration croissante d'urée par paliers de 1 M et incubés 1 h à 30°C. Après sédimentation du matériel insoluble par centrifugation, les fractions solubles sont analysées par SDS-PAGE.

Pour l'obtention d'une quantité de protéine recombinante suffisante à la purification, 1 g de culot contenant les corps d'inclusions est resuspendu avec 50 mL de tampon de lyse, contenant une concentration non dénaturante d'urée. Cette étape a pour objectif de solubiliser et d'éliminer un maximum de protéines contaminantes. Enfin, après ce lavage, les protéines d'intérêt sont solubilisées avec du tampon de lyse contenant 8 M d'urée puis centrifugées à 10 000 x g, afin de les purifier.

➤ **Préparation de la fraction microsomale**

Lors de la lyse cellulaire, les membranes provenant de la membrane plasmique peuvent former des vésicules, appelées microsomes, contenant des protéines membranaires

ou associées. Bien qu'insolubles dans le tampon de lyse, ces microsomes ne sédimentent pas lors de l'étape de centrifugation à 10 000 x g. Ainsi, la fraction microsomale est purifiée par ultracentrifugation de la fraction soluble à 100 000 x g pendant 1 h. Le culot membranaire est repris dans 2 mL de tampon composé de Tris-HCl 50 mM, glycérol 10% (p/v) (pH 8), homogénéisé dans un tube de Potter et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2.3.2. Expression en système levure

➤ Transformation de *P. pastoris*

L'expression des protéines recombinantes en système levure est effectuée en utilisant la souche X-33 de *P. pastoris* (Cf. 2.1.1.7.) transformée par électroporation avec le vecteur pGAPZB (Cf. 2.1.1.2.). Afin de rendre les cellules X-33 électrocompétentes, 500 mL de milieu YPG sont inoculés avec 0,5 mL d'une pré-culture et cultivés à 30°C sous agitation orbitale, durant une nuit. Lorsque la DO_{600} atteint une valeur de 1,3 - 1,5, les cellules sont sédimentées par centrifugation (2 000 x g) et re-suspendues dans 500 mL d'eau stérile glacée (à 4°C). Les cellules sont ensuite de nouveau sédimentées par centrifugation et le culot est re-suspendu avec 250 mL d'eau stérile glacé (à 4°C). Ces étapes permettent d'éliminer les sels contenus dans le milieu culture et qui interfèrent avec la technique d'électroporation. Enfin, après une nouvelle sédimentation, les cellules sont re-suspendues dans 1 mL de sorbitol glacial (1 M) et utilisées pour la transformation.

Afin de transformer *P. pastoris*, il est nécessaire de linéariser le pGAPZB avant d'effectuer l'étape d'électroporation, le site de restriction de l'enzyme *Avr II*, utilisée pour la linéarisation, se situant dans la séquence du P_{GAP} (Cf. Figure 54). En effet, cette transformation, qui s'effectue par recombinaison avec le gène *gap* dans le génome de *P. pastoris* (Figure 56), est beaucoup plus efficace lorsque le vecteur est sous forme linéaire. Pour cela, le plasmide est linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction *Avr II* et purifié comme décrit précédemment (Cf. 2.2.2.3.). Enfin, 80 µL de cellules électrocompétentes sont transformées, par un choc électrique de 2 kV durant 5 ms (cuvettes de 0,2 cm), avec 5 à 10 µg de plasmide linéarisé. Ainsi, lors de la transformation de *P. pastoris* la partie 3' du P_{GAP} du pGAPZB se recombine avec la partie 5' du P_{GAP} génomique (Figure 56). De manière similaire, la partie 5' du P_{GAP} du pGAPZB se recombine avec la partie 3' du P_{GAP} du génome de *P. pastoris*, aboutissant *in fine*, à l'insertion du gène d'intérêt ainsi que du gène de résistance à la zéocine dans le génome de *P. pastoris* (Figure 56).

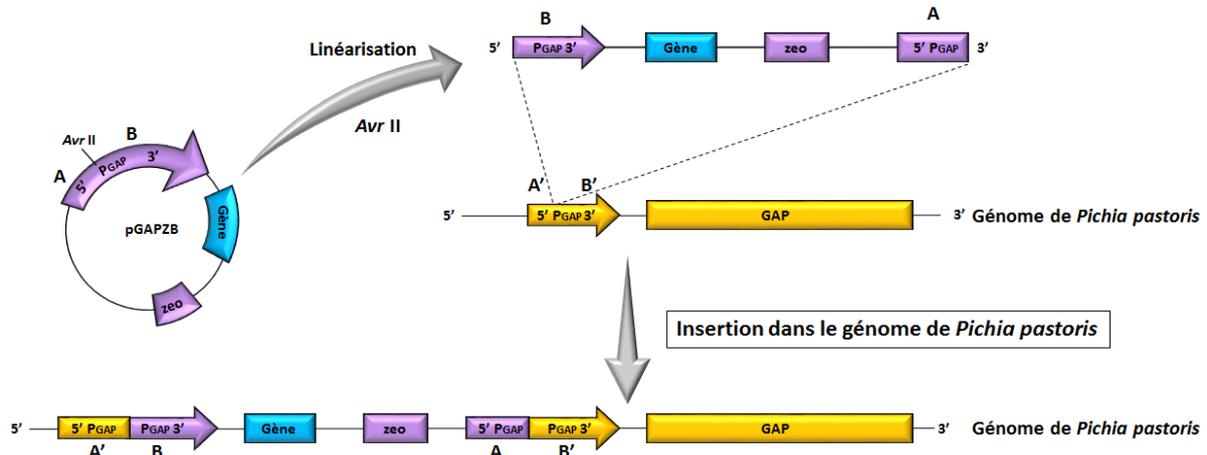


Figure 56 : Représentation schématique de la transformation de *P. pastoris* avec le pGAPZB par recombinaison homologue.

➤ **Obtention des clones recombinants**

Après transformation, les cellules sont étalées et sélectionnées sur boîtes de YPG-Agar, supplémenté de 100 µg/mL de zéocine. Après 3 jours d'incubation à 30°C, les clones résistants sont repiqués, étalés sur boîtes de YPG-Agar, supplémenté de zéocine, et remis à incuber à 30°C durant 3 jours. Afin de s'assurer de l'intégration génomique du pGAPZB, les clones obtenus sont testés par PCR. Pour cela, les cellules sont prélevées à l'aide d'une öse stérile, re-suspendues dans 100 µL de tampon contenant 10 mM de Tris-HCl (pH 8) et 0,1 mg/mL de zymolyase et incubées à 30°C durant 1 h. La zymolyase est une enzyme utilisée pour digérer la paroi cellulaire de *P. pastoris*, principalement composée de polysaccharides. Cette enzyme est préparée à partir de *Arthrobacter luteus* et présente des activités β-1,3-glucan laminaripentaohydrolase (libération de glucose et de laminaripentaose) et β-1,3-glucanase (libération de glucose). Enfin, après digestion de la paroi, les cellules sont lysées par 3 passages au micro-onde durant 20 s et testées par PCR comme décrit précédemment (Cf. 2.2.2.5), en utilisant une amorce sens située sur le promoteur et une amorce anti-sens interne au gène d'intérêt.

➤ **Tests d'expression**

Afin de s'assurer de l'expression de la protéine d'intérêt, les clones recombinants, positifs par PCR, sont ensuite mis en pré-culture dans 5 mL de milieu YPG en présence de zéocine durant une nuit. Le lendemain, les cellules sont mises en culture durant 7 jours à 30°C en présence de 100 µg/mL de zéocine. Chaque jour, un aliquot est prélevé, sa DO₆₀₀ est mesurée, les cellules sont sédimentées par centrifugation à 2 000 x g et les culots sont conservés à -20°C, jusqu'à leur analyse.

➤ **Préparation des échantillons à analyser**

Afin d'analyser l'expression des protéines d'intérêt, les cellules sont lysées. Pour cela, les culots cellulaires sont re-suspendus dans un tampon de lyse composé de 20 mM Tris/HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 200 mM sucrose, supplémenté de 0,1 mg/mL de zymolyase et incubés durant 2 h à 30°C. Après incubation, les cellules sont lysées à l'aide d'un broyeur à bille (bead-beater) en effectuant 5 cycles de 30 s. Enfin, après sédimentation des billes et du matériel cellulaire insoluble, les surnageants sont récupérés pour être analysés par SDS-PAGE, par immuno-révélation et / ou par suivi de l'activité enzymatique. Les tests d'activité ont été réalisés en utilisant le test choline oxydase / peroxydase (Cf. 2.2.7.) et la signification statistique a été déterminée en utilisant le test t de Student non-apparié (bilatéral). Les échantillons ont été considérés comme significativement différents pour des valeurs de $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) et $P < 0,001$ (***).

➤ **Production des protéines recombinantes**

À l'instar de la production en système bactérien, il est nécessaire d'effectuer des cultures cellulaires à plus grande échelle, afin d'obtenir les protéines cibles en quantités suffisantes pour les étapes de purification. Pour cela, 50 mL de pré-culture dans du milieu YPG, sontensemencées et incubées sous agitation toute la nuit à 30°C en présence de 100 µg/mL de zéocine. Le lendemain, les levures sont mises en culture par l'inoculation de 10 mL de pré-culture dans 1 L de milieu YPG et incubées durant 3 à 5 jours sous agitation orbitale à 30°C.

Après culture, les levures sont sédimentées par centrifugation pendant 10 min à 4 000 x g et le culot cellulaire est re-suspendu avec 40 mL de tampon de lyse (20 mM Tris/HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 200 mM sucrose). Les levures sont ensuite incubées durant 2 h à 30°C en présence de 0,1 mg/mL de zymolyase. Enfin, les cellules sont lysées par sonication (3 cycles de 3 min avec un intervalle de 1 min), centrifugées pendant 1 h à 5 000 x g et le surnageant utilisé pour la purification de la protéine cible.

2.2.4. Purification des protéines

2.2.4.1. Purification par chromatographie d'affinité

Les protéines solubles sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni²⁺ immobilisé. Pour cela, des colonnes (Protino, Machery-Nagel, France) contenant un gel de silice où le Ni²⁺ est immobilisé soit par le TED, soit par le NTA sont utilisées. Ce type de chromatographie se base sur l'affinité des histidines pour les ions métalliques tels que le nickel ou le cuivre. Après équilibrage de la colonne, l'extrait protéique est chargé pour

passer au travers des billes. Après lavage de la colonne, les protéines immobilisées sont éluées par compétition avec de l'imidazole ou par chélation des ions métalliques avec de l'EDTA. Le tampon utilisé pour la purification en conditions natives est composé de NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM (pH 8). Pour la purification en conditions dénaturantes, le même tampon est additionné de 8 M d'urée (pH 8). Les tampons d'éluion sont quant à eux supplémentés de 250 mM d'imidazole (pH 8).

2.2.4.2. Purification de la PLD α

La purification de la PLD α est effectuée en utilisant la méthode mise au point par Lambrecht et Ulbrich-Hofmann (Lambrecht *et al.*, 1992). Pour cela, l'extrait cellulaire contenant la PLD α à purifier est tout d'abord dialysé contre un tampon composé de 30 mM de tampon PIPES (pH 6,2) et 50 mM de CaCl_2 . Après sédimentation du matériel insoluble, l'extrait brut dialysé est chargé sur une colonne d'Octyl-Sépharose CL-4B (2,5 x 8 cm) à un débit de 0,5 mL/min. La colonne est par la suite lavée avec l'équivalent de 3 volumes de colonne avec du tampon 10 mM de PIPES (pH 6,2) 30 mM de CaCl_2 à 1 mL/min. Enfin, la PLD α est éluée par chélation des ions calcium avec un tampon composé de 10 mM de PIPES (pH 6,2) et 0,1 mM d'EDTA.

2.2.3.3. Dessalage et concentration

Les constituants des tampons utilisés pour l'éluion des protéines recombinantes peuvent interférer avec les expériences de caractérisation subséquentes. En effet, l'imidazole interfère notamment avec les expériences de fluorescence tandis que le phosphate de sodium précipite en présence de calcium (formation de phosphate de calcium). C'est pourquoi, il est nécessaire de changer le tampon des solutions protéiques. Pour cela, une colonne de dessalage PD-10 (Amersham Bioscience) est utilisée. Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion dont la limite supérieure d'exclusion est de 5 kDa. Ainsi, les protéines sont éluées dans le volume mort de la colonne, tandis que les petites molécules se retrouvent piégées dans les pores de la résine et sont éluées après les protéines. Enfin, les protéines sont concentrées par ultrafiltration sur une membrane de type Amicon (Millipore) dont la limite inférieure d'exclusion est de 30 kDa (pour des protéines globulaires).

2.2.5. Méthodes d'analyse des protéines

2.2.5.1. Estimation de la quantité de protéines

La quantité de protéines est estimée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le réactif de Bradford (Bio-Rad) contient du bleu de Coomassie qui, en milieu acide, à la propriété de se lier aux résidus basiques et aromatiques des protéines. Cette interaction aboutit à un déplacement du maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm. La quantité de protéines est déduite par rapport à une gamme de référence effectuée avec de la BSA, dans les mêmes conditions expérimentales.

2.2.5.2. SDS-PAGE

Le SDS-PAGE est une méthode d'électrophorèse, en conditions dénaturantes, employée pour séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire (Laemmli, 1970). Pour cela, les protéines sont dénaturées à l'aide du tampon de Laemmli composé de 40 mM de Tris/HCl (pH 6,8), 2% de SDS, 20% de glycérol, 1,7% (v/v) de β -mercaptoéthanol et 0,002% (p/v) de bleu de bromophénol. Ainsi, cette technique utilise du β -mercaptoéthanol, qui permet de réduire les ponts disulfures, ainsi que du SDS, un détergent anionique, qui combiné à la chaleur (95°C) permet de dénaturer les protéines. En effet, ce détergent se fixe sur les protéines dénaturées et permet de leur apporter une charge propre négative. Ainsi, toutes les protéines migreront vers l'anode, indépendamment de leur pH isoélectrique, le critère de séparation se faisant uniquement sur la base de leur masse moléculaire et de la taille des pores du gel.

Le tampon de migration, utilisé pour l'électrophorèse est composé de 25 mM Tris, 192 mM glycine et 0,1% SDS (pH 8,3). La solution de coloration au bleu de Coomassie est composée de 50% d'éthanol, 10% d'acide acétique et de 0,1% (p/v) de bleu de Coomassie R250. La solution de décoloration est composée de 10% (v/v) d'éthanol et 7% (v/v) d'acide acétique.

2.2.5.3. Transfert des protéines sur membrane et révélation par immunoempreinte

Après migration des protéines sur SDS-PAGE, les protéines sont ensuite transférées sur une membrane hydrophobe de polyfluorure de vinylidène (PVDF) préalablement imbibée dans du méthanol. Cette étape d'activation de la membrane est nécessaire pour la rendre poreuse et hydrophile. Le transfert des protéines est généralement réalisé avec un tampon de transfert composé de Tris 25 mM (pH 8), glycine 192 mM, éthanol

20% (v/v) pendant 1 h à 100 mA (ampérage constant). Néanmoins, dans le cas où les protéines sont transférées pour la détermination de leur séquence N-terminale, le tampon de transfert contenant 50 mM Tris, 50 mM borate, pH 8.3, est utilisé.

Afin d'éviter une fixation non spécifique des anticorps, la membrane est saturée avec une solution de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM (pH 7,4)), contenant 0,1% de Tween 20 ainsi que 3% (p/v) de lait écrémé ou 1% de BSA pendant 1 h à température ambiante et sous agitation. Après lavage avec un tampon PBS-Tween 20 à 0,05 % (v/v), la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine cible, dans du PBS-Tween 20 et durant une nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois 30 min avec du PBS-Tween 20 et incubée 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase du raifort.

Dans le cas de l'analyse de protéines recombinantes fusionnées à une étiquette 6xHis, un seul anticorps est utilisé. Il s'agit d'un anticorps anti-polyhistidine couplé à la peroxydase du raifort (HRP) (Sigma-Aldrich) qui est incubé (2,5 à 5 µg/mL) durant 2 h à température ambiante dans du PBS-Tween 20. Enfin, dans les deux cas, la membrane est lavée 3 fois 30 min dans le même tampon afin d'éliminer l'excès d'anticorps. La révélation est effectuée par une incubation de 5-10 min avec une solution composée de 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) à 0,05% et de H₂O₂ à 0,03% (v/v) dans du PBS. Le DAB oxydé précipite en produisant une couleur brune.

2.2.6. Renaturation et analyse des domaines C2

2.2.6.1. Renaturation des domaines C2

Plusieurs méthodes de renaturation de protéines telles que la renaturation lente par dialyse à l'équilibre et la renaturation par dilution rapide ont été utilisées dans ce travail. Pour les expériences de renaturation lente, les protéines sont diluées à 100 µg/mL (dans du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, urée 8 M (pH 8)) et dialysées durant une nuit contre le même tampon sans urée. Concernant la renaturation par dilution rapide, les protéines sont diluées à 100 µg/mL (dans du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM (pH 8)) sous agitation durant 1 h, puis dialysées comme précédemment, sous agitation rapide à 50 rpm, dans le même tampon en l'absence d'urée.

2.2.6.2. Analyse de la renaturation par fluorescence intrinsèque

Toutes les expériences ont été effectuées à température ambiante avec une largeur de fente de 10 nm pour l'excitation et l'émission. Les spectres ont été acquis avec un spectrofluorimètre Hitachi F-4500 dans des cuves en quartz de 1 mL (trajet optique de 1 cm). Pour leur renaturation, les domaines C2 α et C2 β ont été concentrés à 20 mg/mL et dilués au 1/500, au moment de leur utilisation. L'émission de leur fluorescence a été acquise entre 300 et 400 nm après excitation à 280 nm. Les spectres ont été corrigés par la fluorescence des tampons et lissés en moyennant sur 5 points. Concernant l'addition des ions calcium, 1 μ L d'une solution stock a été ajouté. Celle-ci est composée de 1 M de CaCl₂ dilué dans du Tris-HCl 50 mM et NaCl 150 mM (pH 8).

2.2.6.3. Analyse de la renaturation par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est une spectroscopie d'absorption, dans l'UV proche et lointain, qui renseigne sur les structures secondaires des protéines étudiées. Cette méthode se base sur la différence d'adsorption entre des ondes polarisées à gauche et à droite que présentent les liaisons amides des squelettes carbonés des protéines. En effet, ceux-ci sont placés entre deux carbones asymétriques (carbones α) et absorbent différemment les lumières polarisées en fonction des angles φ et ψ . Ainsi, l'angle d'ellipticité Θ peut être déduit de l'onde résultante et converti en ellipticité molaire, exprimé en degré.cm²/dmol. Ainsi, le spectre dichroïque caractéristique des hélices α présente un maximum d'ellipticité molaire à 195 nm et deux *minima* à 208 nm et à 222 nm. Pour les feuillettes β antiparallèles, on observe généralement un maximum à 195 nm et un seul minimum à 218 nm. Enfin, les protéines non structurées sont, quant à elles, caractérisées par un minimum d'ellipticité molaire à 195 nm et une très faible ellipticité à 210 nm (Greenfield, 2006).

Pour la renaturation des protéines, le domaine C2 α a été concentré à 40 mg/mL et le domaine C2 β à 20 mg/mL, chaque protéine a été diluée au 1/150 dans du tampon NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM (pH 8) contenant 50 mM d'urée. Les spectres ont été acquis entre 200 et 400 nm dans des cuves de 1 mm de trajet optique à température ambiante et corrigés avec le tampon seul, avec la même concentration finale d'urée (50 mM). Les spectres ont été réalisés à l'aide d'un dichrographe ChriScan (*Applied Photophysics*) situé sur la plateforme de biophysique de l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP, Lyon).

2.2.6.4. Étude de l'interaction protéine-lipide par "dot-blot"

Dans un premier temps, les lipides (20 nmol), dissouts dans le chloroforme, ont été déposés sur une membrane de PVDF et laissés évaporer sous une hotte. De même, les domaines C2 α ou C2 β possédant une étiquette 6xHis ont été déposés sur la membrane de PVDF en tant que témoin positif de révélation par les anticorps anti-6xHis. La membrane a été saturée en l'incubant dans une solution de BSA (5%, p/v), dépourvue d'acides gras, dans un tampon TBS (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 27 mM KCl, à pH 7,2) à température ambiante pendant 1 h. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4 °C, soit avec le tampon TBS/BSA seul, soit avec les domaines C2 α ou C2 β renaturés et dilués dans du TBS / BSA, en présence de 1 mM de Ca²⁺ ou 1 mM d'EDTA. Après trois lavages avec du TBS / BSA, la membrane a été incubée 1 h en présence de TBS / BSA additionné de 0,2% (v/v) de Tween 20. L'anticorps monoclonal de souris anti-6xHis couplé à la HRP a ensuite été ajouté et mis à incuber à température ambiante pendant 1 h. Enfin, les membranes ont été lavées trois fois avec le même tampon et les protéines liées aux lipides ont été révélées comme décrit précédemment (2.2.5.3.).

2.2.6.5. Transfert d'énergie de fluorescence FRET

La fixation des domaines C2 α et C2 β aux vésicules de phospholipides a été réalisée par transfert d'énergie ou "*Förster Resonance Energy Transfer*" (FRET) depuis les tyrosines et tryptophanes vers le dansyl-PE. Pour ce faire, les liposomes de phospholipides ont été réalisés par extrusion, en passant sept fois la solution au travers d'un filtre de 100 nm, en utilisant un mini-extrudeur (Avanti Polar Lipids).

Les liposomes utilisés sont composés du phospholipide à étudier et supplémentés de 5% de dansyl-PE. Le diamètre hydrodynamique moyen des liposomes, en l'absence ou en présence de Ca²⁺ a été vérifié en effectuant des expériences de diffusion dynamique de la lumière (*DLS : Dynamic Light Scattering*) dans une cuvette de 1 mL sur un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Royaume-Uni). Les fixations relatives ont été examinées en additionnant 20 μ M de liposomes avec 1 μ M de domaine C2 ou avec le tampon (50 mM de tampon HEPES, pH 8) seul, comme décrit précédemment (Tiwari *et al.*, 2011).

Toutes les expériences de fluorescence ont été effectuées à 30°C en utilisant un lecteur de microplaques Tecan infinite M200 (Salzbourg, Autriche) dans un volume de 150 μ L final, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées à 280 nm et 510 nm, respectivement. Par ailleurs, les fentes ont été fixées à 10 nm et 20 nm pour l'excitation et l'émission, respectivement. Le FRET relatif a été calculé en corrigeant les intensités de fluorescence obtenues : $(I-I_0)/I_0$, où I et I₀ correspondent aux intensités de fluorescence à 510

nm du domaine C2 et du tampon seul, respectivement. L'effet du Ca^{2+} a été mesuré en ajoutant un volume de 2 μL de CaCl_2 , qui correspond à 1,3 % du volume final, et suivi d'une incubation pendant 10 min à 20°C avant la mesure.

2.2.6.6. Modélisations moléculaires des domaines C2 des PLD α et - β

Pour modéliser les domaines C2 α et - β par analogie, leurs séquences protéiques ont été soumises aux serveurs Geno3D, Phyre et I-Tasser. Cette méthode de modélisation se base sur le principe que les structures 3D sont plus conservées que les séquences peptidiques. Pour cela, les structures secondaires sont prédites et les protéines possédant la même topologie sont identifiées. Ceci autorise la modélisation de protéine ayant un faible taux d'homologie avec celles disponibles dans la banque de données (PDB, *Protein Data Bank*).

Les modèles obtenus par les trois serveurs ont été analysés et un seul modèle pour chaque domaine a été retenu. Ces derniers ont ensuite été affinés à l'aide du serveur ModRefiner, le serveur Rampage a permis d'analyser leur diagramme de Ramachandran, et leurs ligands potentiels ont été sélectionnés grâce au serveur Cofactor. Finalement, l'énergie des modèles a été minimisée avec le logiciel UCSF Chimera, en présence et en absence de ligands et après l'ajout des hydrogènes. Pour cela, 5000 étapes de *Steepest Descent* et 1000 étapes de *Conjugate Gradient* ont été effectuées en utilisant le champ de force AMBER ff03.r1 pour la protéine et AM1-BCC pour les ligands. Le positionnement des domaines C2, par rapport avec la membrane, a été effectué à l'aide du serveur PPM (*Positioning of Proteins in Membrane*).

2.2.7. Mesure de l'activité enzymatique de la PLD

2.2.7.1. Test chromogénique

L'hydrolyse des phospholipides par la PLD a pour conséquence la formation du PA et la libération de la tête polaire dans le milieu réactionnel. Ainsi, dans le cas de l'hydrolyse de la PC, la choline libérée dans le milieu réactionnel peut être dosée de manière spectrophotométrique. Ceci s'effectue *via* une cascade enzymatique, faisant intervenir la choline oxydase et la peroxydase (Takrama *et al.*, 1991) (Cf. 1.8.3.1., Figure 47). En effet, en présence d'un excès de choline oxydase et peroxydase ainsi que de 4-aminoantipyrine et d'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique, le produit final obtenu est un chromogène qui absorbe à 500 nm. Il est donc possible de suivre l'activité enzymatique de la PLD et de déterminer la quantité de choline libérée à partir d'une gamme étalon effectuée avec de la choline, dans les mêmes conditions expérimentales. Cette gamme de choline est linéaire

pour des concentrations de choline comprises entre 0 et 0,25 mM. Afin de réaliser le test enzymatique, des quantités connues de substrat (PC), en solution chloroformique, sont introduites dans un tube à essai et sont séchées sous azote. Le substrat phospholipidique est ensuite dispersé par sonication dans une solution contenant des concentrations équimolaires de SDS et de Triton X-100 (0,85 mM). Le test est ensuite réalisé sur plaques de microtitration en utilisant un spectrophotomètre TECAN Infinite M200.

➤ **Mesure en continu**

Ce test est réalisé dans un volume final de 150 μ L contenant 0,26 mM de PC en présence de 50 mM de Tris/HCl (pH 8), 50 mM de CaCl_2 , 0,5 U de choline oxydase, 0,5 U de peroxydase, 5 mM de 4-aminoantipyridine, 8 mM d'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique ainsi que l'échantillon à doser. L'activité enzymatique de la PLD est suivie par lecture de l'absorbance à 500 nm toutes les 30 s pendant 10 min. Une unité d'activité de la PLD est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mol/min de choline dans les conditions du test.

➤ **Mesure en point final**

À l'inverse du test continu, celui-ci s'effectue en deux temps. Tout d'abord, la réaction PLD est réalisée dans un volume final de 100 μ L contenant 0,26 mM de PC en présence de 50 mM de Tris/HCl (pH 8), 50 mM de CaCl_2 , ainsi que l'échantillon à doser. Après une incubation de 5 à 10 min, la quantité de choline libérée dans le milieu est ensuite dosée par l'ajout de 50 μ L d'une solution contenant 10 mM de Tris/HCl (pH 8), 0,1 U de choline oxydase, 0,1 U de peroxydase, 5 mM de 4-aminoantipyridine, 8 mM d'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique ainsi que 300 mM d'EDTA. Ainsi, tandis que l'EDTA permet de stopper la réaction PLD, par chélation du Ca^{2+} , la choline libérée est dosée grâce à la cascade choline oxydase / peroxydase. Après une incubation de 30 min, l'absorbance à 500 nm de la réaction est lue et la quantité de choline est déterminée en utilisant la gamme étalon. Une unité d'activité de la PLD est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mol/min de choline dans les conditions du test.

2.2.6.2. Réaction de transphosphatidylatation et analyse par CCM

La réaction de transphosphatidylatation est effectuée dans un volume final de 0,5 mL, contenant 0,26 mM de PC dispersée dans un mélange équimolaire de SDS et de Triton X-100 (0,83 mM, chacun), 50 mM de Tris/HCl (pH 8), 20 mM de CaCl_2 et 2% (v/v) d'éthanol ou de butanol. Après 10 min d'incubation à 37°C, les phospholipides sont extraits avec 0,8 mL d'une solution de chloroforme-méthanol (2:1, v:v), selon la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957). La phase chloroformique, contenant les lipides, est collectée après centrifugation à

1 000 x g pendant 3 min, puis évaporée sous azote. Les phospholipides sont ensuite solubilisés dans des volumes variables de chloroforme-méthanol (2:1, v:v) et analysés par CCM, en utilisant un solvant de migration composé de chloroforme/méthanol/acide acétique (65/15/1, v/v/v). Les lipides sont finalement révélés par l'emploi de sulfate de cuivre ou par exposition de diiode (I_2), sous forme de vapeur.

2.2.8. Dosage du PA par la 8HQ

2.2.8.1. Préparation des micelles mixtes 8HQ / phospholipide / détergent

Afin de préparer les micelles mixtes, 40 nmol de phospholipides (dissouts dans du chloroforme) ont été évaporés sous un flux d'azote, puis resuspendus dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM de détergent, 66 μ M de 8HQ, 50 μ M d'EDTA et 20 mM de $CaCl_2$. La solution micellaire a, ensuite, été dispersée par sonication pendant 10 minutes, en utilisant un bain de sonication (Deltasonic Type O11C, Fécamp, France). La suite des expériences a été effectuée dans les conditions optimisées comprenant 40 nmol de phospholipides dispersés dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS, 66 μ M de 8HQ, 50 μ M d'EDTA et 20 mM de $CaCl_2$. Les volumes hydrodynamiques des micelles mixtes composées de PC ou de PA ont été vérifiés par DLS, comme décrit précédemment (Cf. 2.2.6.5.).

Afin de suivre la fixation spécifique de la 8HQ au PA, toutes les expériences de fluorescence ont été enregistrées à 30 °C, en utilisant un lecteur de microplaques Tecan infini M200 (Salzbourg, Autriche). Les spectres ont été enregistrés entre 400 nm et 650 nm après une excitation à 366 nm, en utilisant des largeurs de bande de 10 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission, tandis que les intensités de fluorescence ont été enregistrées à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en utilisant des largeurs de bande de 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission.

2.2.8.2. Temps de détection du PA par la 8HQ

Pour le suivi du temps de détection du PA par la 8HQ, des micelles contenant des quantités variables de POPC / POPA ont été préparées, comme décrit en 2.2.8.1., mais en l'absence de Ca^{2+} , donnant un volume final de 140 μ L. Par la suite, l'intensité d'émission de fluorescence à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) a été enregistrée en fonction du temps en utilisant des bandes passantes de 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission. Enfin, après 120 s d'incubation, 10 μ L d'une solution de Ca^{2+} , composée de 10 mM de Tris/HCl et de 300 mM de $CaCl_2$ (pH 8) ont été injectés afin d'obtenir une concentration finale de 20 mM de Ca^{2+} et un volume final de 150 μ L.

2.2.8.3. Gamme étalon

La courbe d'étalonnage a été obtenue par incubation de la 8HQ avec les micelles mixtes contenant des quantités variables de POPC / POPA, en présence de 20 mM de Ca²⁺ et dans un volume final de 150 µL. Chaque valeur a été obtenue en augmentant la proportion de PA tout en diminuant la proportion de PC afin de maintenir une concentration finale de phospholipides constante (266 µM). Les données obtenues ont été traitées avec à l'équation suivante (1) :

$$I_f = \frac{a [PA]}{b + [PA]} + I_{f0} \quad (1)$$

I_f et I_{f0} sont les intensités de fluorescence respectivement obtenues en présence ou en l'absence (fluorescence basale) de PA, a et b sont des constantes, et $[PA]$ désigne la concentration PA ajoutée. La limite de détection (LOD – *Limit of detection*) est calculée en fonction de la définition de $LOD = 3 \times$ écart-type de la régression non linéaire (méthode des moindres carrés) à partir des données expérimentales et la sensibilité est calculée en faisant le rapport a / b .

2.2.8.4. Utilisation du test 8HQ

Typiquement, les tests basés sur l'utilisation de la 8HQ sont réalisés avec les conditions optimisées (2.2.8.1.) dans un volume final de 150 µl. Afin de suivre la formation de PA par la PLD, les micelles contenant les phospholipides substrats souhaités (266 µM, concentration finale) ont été préparées comme décrit en 2.2.8.1. (50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS, 66 µM de 8HQ, 50 µM d'EDTA et 20 mM de CaCl₂). Les intensités de fluorescence sont enregistrées à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en utilisant des largeurs de bande de 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission. La fluorescence basale I_{f0} (Cf. équation (1)) est enregistrée pendant 120 s, puis la PLD est injectée (4-800 ng / puits) et l'intensité du signal de fluorescence est enregistrée avec des intervalles de 30 s, durant 30 min. Pour chaque cinétique, les quantités de PA sont déterminées en utilisant l'équation (2) :

$$[PA] = \frac{b(I_f - I_{f0})}{a - (I_f - I_{f0})} \quad (2)$$

Les quantités de PA sont déterminées à partir de la portion droite de la cinétique ($R^2 > 0,97$), qui correspond à la phase linéaire de la réaction. Une unité d'activité PLD est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 µmol de PA par min dans ces conditions expérimentales.

2.2.8.5. Suivi des réactions de transphosphatidylation et tests d'inhibition

Le suivi des réactions de transphosphatidylation ainsi que les tests d'inhibition ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales en ajoutant 5 μL d'alcool ou de molécule à tester afin d'obtenir un volume final de 155 μL .

2.2.8.5. Modifications chimiques de la 8HQ

Les modifications chimiques de la 8HQ ont été réalisées au laboratoire CO2GLYCO (ICBMS) en collaboration avec le Dr Michele FIORE. Les dérivés ont été testés à une concentration de 66 μM (concentration finale) sauf pour la 8HQ5S12N qui a été testée à une concentration de 6 μM (concentration finale), dans les conditions optimisées (40 nmol de phospholipides dispersés dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS, 50 μM d'EDTA et 20 mM de CaCl_2). Les spectres ont été enregistrés entre 400 nm et 650 nm après une excitation à 366 nm, en utilisant des largeurs de bande de 10 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission.

2.2.8.5. Formation des vésicules géantes et visualisation par microscopie

Les vésicules géantes (GV) ont été formées par hydratation lente des phospholipides. Pour cela, une solution de 5 mL de CHCl_3 , composée de POPC ou d'un mélange POPC / POPA (80 : 20), à une concentration de 1 mM, ainsi que la 8HQ5S12N à une concentration de 0,2 mM, est évaporée dans un ballon à fond rond. L'évaporation est effectuée à l'aide d'un évaporateur rotatif qui permet de former un film lipidique uniformément réparti sur la surface du ballon. Le film est ensuite hydraté par l'ajout de 1 mL de tampon (tampon interne) composé de 50 mM de Tris/Bicine (pH 8), 250 mM de sucrose et 20 mM de CaCl_2 , durant 1 à 2 jours à 30°C. Une fois les GV formées, 2 mL de tampon (tampon externe) composé de 50 mM de Tris/Bicine (pH 8), 250 mM de glucose et 20 mM de CaCl_2 sont ajoutés à la solution. Le glucose et le sucrose ayant la même molarité mais des densités différentes, les GV peuvent être sédimentées par centrifugation, durant 1 min à 2 000 x g, sans créer de choc osmotique qui aboutirait à une rupture des vésicules. Finalement, les GV sont resuspendues dans le tampon externe afin d'être visualisées par microscopie.

La visualisation des GV a été réalisée en collaboration avec le Dr. Le Duy (équipe SynatAc, Institut NeuroMyoGène) sur un microscope confocal Leica SP5 X, en utilisant les filtres DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et GFP (*Green Fluorescent Protein*) pour le suivi de la fluorescence de la 8HQ5S12N. Ces filtres permettent d'observer une gamme spectrale d'émission comprise entre 435-485 nm (filtre DAPI) ou entre 500-550 nm (filtre GFP). Les clichés ont été traités avec le logiciel ImageJ.

3. Résultats et discussions

3.1. Expression, purification et caractérisation biochimique des PLDs et de leurs domaines fonctionnels

3.1.1. Clonage, expression chez *E. coli* et caractérisation des AtPLD α et - β ainsi que de leurs domaines fonctionnels

3.1.1.1. Clonages dans le vecteur pET28b

Afin de caractériser l'implication des domaines C2 dans la régulation des PLDs et de comparer leur interaction avec la membrane, en présence de Ca²⁺, le clonage dans le vecteur pET28b, des PLD α et - β d'*Arabidopsis thaliana* (AtPLD α et AtPLD β) ainsi que de leurs domaines C2 respectifs, a été entrepris.

Lors de mon arrivée, les ADNc, utilisés comme matrices pour les clonages, étaient recombinés dans le pBluescript, un plasmide répliatif à haut nombre de copies. Leur séquence a tout d'abord été vérifiée par séquençage nucléotidique (Eurofins MWG Operon) puis identifiée par recherche heuristique à l'aide du serveur BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). L'ADNc de la PLD α 1 (At3g15730) fourni par le Pr. X. Wang (Université du Missouri, St. Louis) est un variant du génome gi240255695. L'ADNc de la PLD β 1 (At2g42010) fourni par le RIKEN (pdx82318) correspond, quant à lui, au code *Genbank* gi186507338. Afin d'effectuer les clonages (Figure 57), la séquence codant l'AtPLD α a été amplifiée en utilisant le couple d'amorces 095/096 (Cf. 2.1.1.4., Tableau 4). Le couple 098/096 a, quant à lui, permis d'amplifier son domaine catalytique tandis que le couple 095/099 a permis d'amplifier son domaine C2 (C2 α) (Figure 57A).

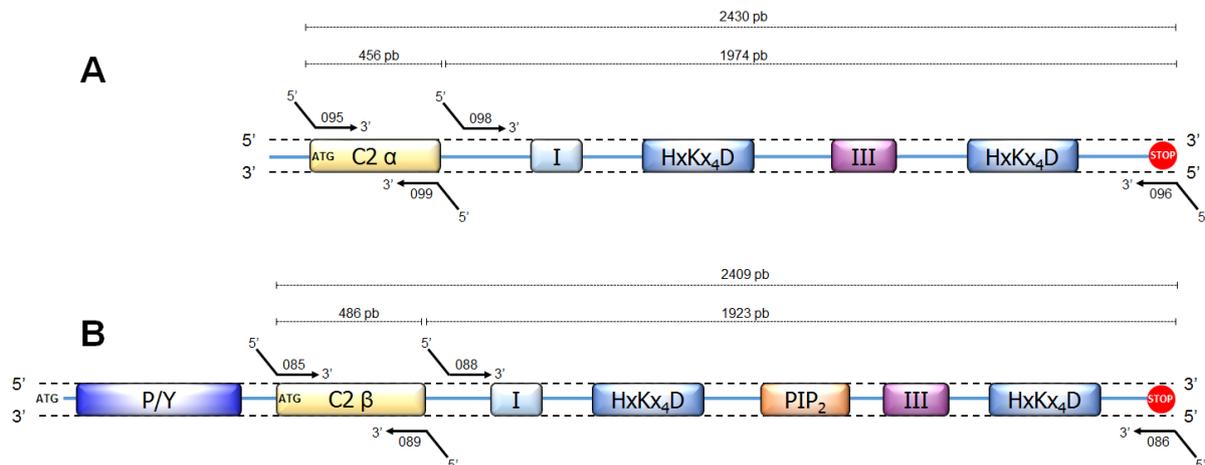


Figure 57 : Position des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant les PLDs et leurs différents domaines. (A) Amplification des séquences codant l'AtPLD α (095/096), son domaine catalytique (098/096) et son domaine C2 (095/099). (B) Amplification des séquences codant l'AtPLD β (085/086), son domaine catalytique (088/086) et son domaine C2 (085/089).

La même stratégie a été employée afin d'amplifier les séquences codant l'AtPLD β et ses domaines fonctionnels. Ainsi, le couple d'amorces 085/086 a été utilisé pour l'amplification de l'AtPLD β tandis que le couple 088/086 a permis d'amplifier son domaine catalytique (Figure 57B). Enfin, le couple 085/089 a permis d'amplifier la séquence codant son domaine C2 (C2 β) (Figure 57B).

Il est à noter que le domaine P/Y de l'AtPLD β n'a pas été étudié durant ce travail de thèse. En effet, ce domaine n'a jamais été décrit dans la littérature, sa séquence étant incomplète lors des premiers clonages (Pappan *et al.*, 1997) et le premier codon initiateur (ATG) se situant alors au début du domaine C2 (Figure 57B). Néanmoins, bien que nous nous soyons basés sur ces travaux, l'analyse de la séquence génomique complète de l'AtPLD β , lors de ce travail de thèse, révèle que ce domaine serait bel et bien présent dans la protéine mature. En effet, ce domaine présente notamment un codon initiateur à son extrémité 5' (Figure 57B) et partage le même exon que le domaine C2 (Exon 1), suggérant ainsi qu'il n'est pas retiré lors d'un hypothétique épissage.

Le clonage dans le vecteur pET28b étant effectué avec les sites de restriction *NcoI*/*NotI*, les amorces 085 et 088 de l'AtPLD β (Cf. 2.1.1.4., Tableau 4) et de ses domaines fonctionnels ont été dessinées avec le site de restriction *NcoI*, tandis que pour l'AtPLD α et ses domaines fonctionnels, le site *PciI* a été inséré dans les amorces 095 et 098 (Cf. 2.1.1.4., Tableau 4). En effet, puisque le gène de l'AtPLD α possède plusieurs sites *NcoI* internes, il a été nécessaire d'utiliser *PciI*, son fragment cohésif après digestion étant compatible avec le fragment cohésif de *NcoI* du pET28b. Néanmoins, les premières bases du second codon des amorces 095 (AtPLD α) et 085 (AtPLD β) ont été remplacées afin d'introduire respectivement les sites *PciI* et *NcoI* (Cf. 2.1.1.4., Tableau 4), conduisant, ainsi, à la mutation A2S pour l'AtPLD α et G2E pour l'AtPLD β . Enfin, les amorces 086, 089, 096 et 099 contiennent le site de restriction *NotI*, qui en l'absence de codon stop permet la fusion dans le cadre de lecture de l'étiquette poly-histidine (6xHis) en C-terminal de ces protéines (Cf. 2.1.1.2.).

L'analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose révèle que les inserts ont été correctement amplifiés (Figure 58). En effet, les amplicons des domaines C2 α (Figure 58A, piste 1) et C2 β (Figure 58B, piste 2) migrent, comme attendu, à une taille moléculaire d'environ 500 pb (Figure 57). De même, les amplicons des domaines catalytiques des AtPLD α (Figure 58A, piste 2) et AtPLD β (Figure 58C, piste 1) migrent à une taille moléculaire d'environ 2000 pb (Figure 57), tandis que ceux des AtPLD α (Figure 58A, piste 3) et AtPLD β (Figure 58B, piste 1) migrent à environ 2500 pb, tel que prévu (Figure 57). Ces résultats ont ainsi permis de cloner les amplicons dans le pET28b afin de les amplifier avec la souche TOP10 d'*E. coli*, tel que décrit dans la partie Méthodes (Cf. 2.2.2.5.).

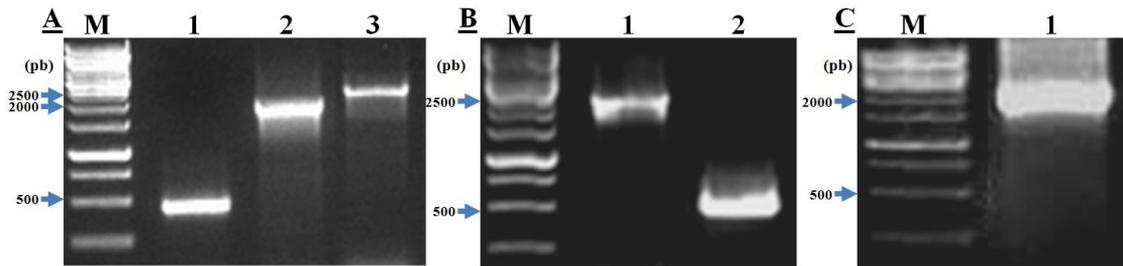


Figure 58 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des amplifications par PCR avec la KOD polymérase sur les ADNc des PLDs. M : Marqueur de taille moléculaire ; (A) Piste 1 : domaine C2 de l'AtPLD α ; piste 2 : domaine catalytique de l'AtPLD α ; piste 3 : AtPLD α ; (B) Piste 1 : AtPLD β ; piste 2 : domaine C2 de l'AtPLD β ; (C) Piste 1 : domaine catalytique de l'AtPLD β .

Ainsi, après transformation et sélection sur boîte, en présence de kanamycine, les clones recombinants ont été criblés par PCR afin de s'assurer de la présence des inserts. La ligation durant la nuit pour un rapport (vecteur / insert) de 1/5 a donné les meilleurs résultats pour les domaines C2 α et - β , avec plus de 50 clones par boîte. Ainsi, les criblages par PCR sur les clones recombinants, révèlent que les inserts du C2 α (Figure 59A, pistes 1 à 5) et du C2 β (Figure 59B, pistes 1, 2 et 5) migrent à des tailles d'environ 250 pb, tel qu'attendu (Cf. 2.1.1.4., Tableau 5).

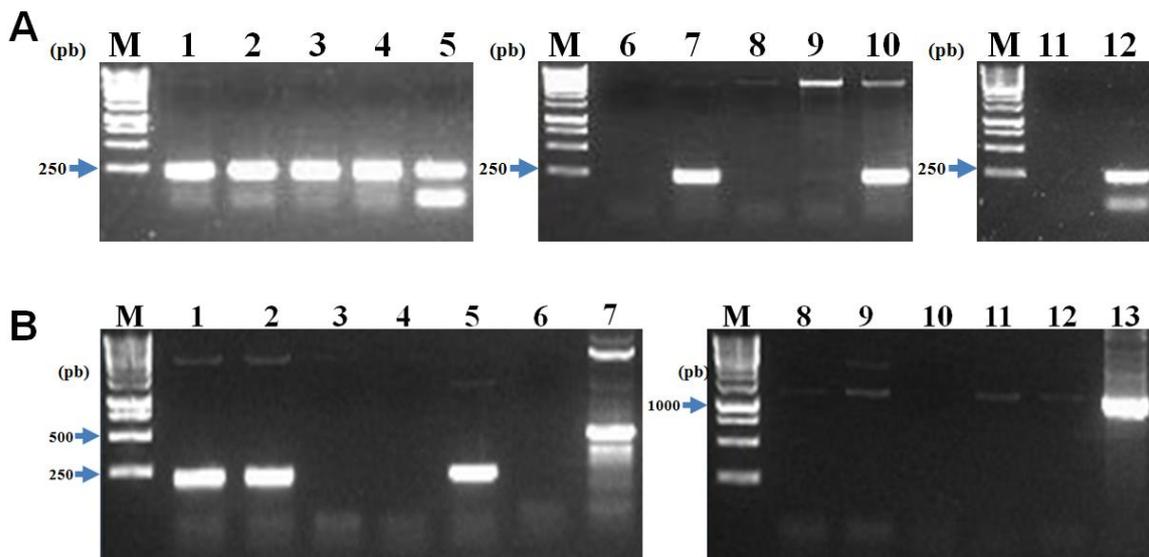


Figure 59 : (A) Criblage par PCR avec la Taq polymérase des clones recombinants pour le domaine C2 de l'AtPLD α sur gel d'agarose 1,5%. M : Marqueur de taille moléculaire ; pistes 1 à 5 : domaine C2 α ; pistes 6 à 10 : AtPLD α ; 11 : contrôle négatif d'amplification (bactéries transformées par le vecteur vide) ; 12 : contrôle positif d'amplification (pBluescript-AtPLD α). (B) Criblage par PCR avec la Taq polymérase des clones recombinants pour l'AtPLD β ou son domaine C2 sur gel d'agarose 1,5%. M : Marqueur de taille moléculaire ; Pistes 1 à 5 : domaine C2 β ; pistes 6 à 11 : AtPLD β ; 12 : contrôle négatif d'amplification (bactéries transformées par le vecteur vide) ; 13 : contrôle positif d'amplification (pdx82318).

A contrario, l'obtention des constructions pour les AtPLD α et - β a été plus difficile. En effet, seule la ligation durant la nuit avec un rapport (vecteur / insert) de 1/5 pour l'AtPLD α et de 1/3 pour l'AtPLD β a permis d'obtenir quelques clones par boîte. À l'instar des domaines C2, le criblage par PCR révèle que les inserts codant l'AtPLD α (Figure 59A, pistes 7 et 10) sont correctement clonés après le promoteur T7, ceux-ci migrant aux tailles moléculaires attendues (224 pb) (Cf. 2.1.1.4., Tableau 5). Ainsi, les clones obtenus, positifs pour la PCR, ont ensuite été cultivés et les plasmides ont été purifiés par midi-préparation, tel que décrit dans la partie Méthodes (Cf. 2.2.2.6.). Concernant l'AtPLD β , les résultats ont été différents des autres constructions, puisque le seul amplicon obtenu migre à une taille de 500 pb (Figure 59B, piste 7) alors qu'une taille de 284 pb était attendue (Cf. 2.1.1.4., Tableau 5). Néanmoins, ce clone a tout de même été purifié par midi-préparation, afin de déterminer la cause de cette augmentation de taille.

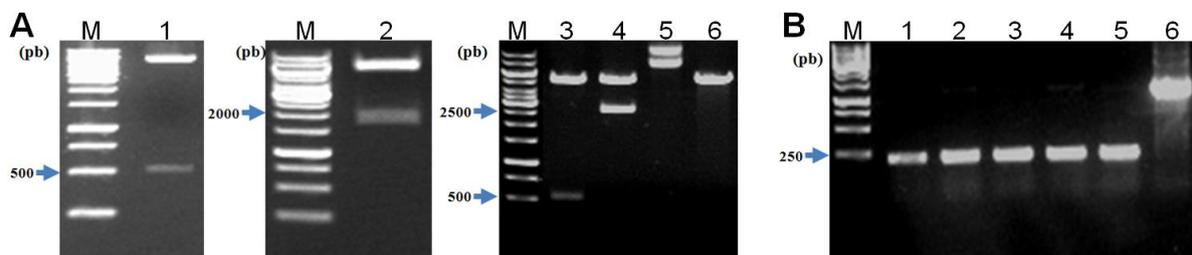


Figure 60 : (A) Vérifications par restriction des constructions purifiées. M : Marqueur de taille moléculaire (pb) ; 1 : pET28b-AtC2 α ; 2 : pET28b-AtPLD α ; 3 : pET28b-AtC2 β ; 4 : pET28b-AtPLD β ; 5 : pET28b non digéré (vecteur vide non digéré, les deux bandes correspondent au vecteur enroulé et surenroulé) ; 6 : pET28b digéré. (B) Criblage par PCR des clones recombinants du pET28b-AtPLD β digéré avec *Nco*I puis reliqué sur lui-même. M : Marqueur de taille moléculaire ; pistes 1 à 5 : AtPLD β ; piste 6 : témoin positif d'amplification (pdx82318).

Toutes les constructions purifiées ont, ensuite, été digérées par les enzymes de restriction indiquées dans le tableau 6 (Cf. 2.1.1.5.), afin de s'assurer de la présence des inserts. Ainsi, l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose démontre que les fragments de restriction des constructions pET28b-AtC2 α (Figure 60A, piste 1), pET28b-AtPLD α (Figure 60A, piste 2) et pET28b-AtC2 β (Figure 60A, piste 3) migrent aux tailles attendues (Cf. 2.1.1.5., Tableau 6). Ces vecteurs ont donc été séquencés et se sont révélés corrects, les gènes étant dans le même cadre de lecture que l'étiquette 6xHis.

Concernant la construction de l'AtPLD β , l'analyse du séquençage de cette construction a montré que l'augmentation de taille observée lors de la PCR (Figure 59B, piste 7) était due à une séquence incorrecte en 5' du gène, aboutissant à une séquence excédentaire, composée de deux sites *Nco*I et des amorces 085 et 086 ainsi qu'une partie du gène de l'AtPLD β . Afin d'éliminer cette séquence non désirée, le vecteur a été digéré avec *Nco*I et reliqué sur lui-même avec la T4 ADN ligase. Ainsi, les analyses par électrophorèse, du criblage par PCR (Figure 60B, pistes 1 à 5) et de la digestion de

restriction (Figure 60A, piste 4), démontrent que les fragments migrent cette fois-ci aux tailles attendues (Cf. 2.1.1.4., Tableau 5). La construction a donc été re-séquencée et s'est révélée correcte, le gène étant cloné dans le même cadre de lecture que l'étiquette 6xHis.

Enfin, concernant les domaines catalytiques des AtPLD α et - β , ceux-ci ont été clonés de la même manière mais n'ont pas été étudiés par la suite, la priorité de ce travail de thèse étant donné à la caractérisation des domaines C2 et des enzymes complètes.

3.1.1.2. Expression et purification des domaines C2 α et C2 β

Après transformation des bactéries BL21 par les constructions codant les domaines C2 α et C2 β ainsi que par le vecteur vide, servant de témoin négatif d'expression, les clones ont été sélectionnés sur boîte de LB-Agar en présence des antibiotiques adéquats et mis en culture, comme décrit dans la partie Méthodes (Cf. 2.2.3.1.). L'expression des deux domaines a, ensuite, été criblée par SDS-PAGE, après induction à l'IPTG et par comparaison avec leur valeur théorique de masse moléculaire (Tableau 7), obtenues avec le serveur *ProtParam* d'ExpASy.

Tableau 7 : Paramètres théoriques des protéines exprimées. aa : nombre d'acides aminés.

Protéine	aa	Masse moléculaire (kDa)	pH isoélectrique
Domaine C2 α	163	18,3	6,37
Domaine C2 β	174	19,1	6,89

Ainsi, comme le montre le profil de migration sur SDS-PAGE (Figure 61), les domaines C2 α (Figure 61, piste 2) et C2 β (Figure 61, piste 3) sont fortement exprimés, lors d'une induction de 4 h à 37°C. En effet, ces deux domaines migrent à des masses moléculaires comprises entre 17 kDa et 20 kDa, tel qu'attendu (Tableau 7), par rapport aux cellules transformées avec le vecteur vide (Figure 61, piste 1), servant de contrôle négatif d'expression.

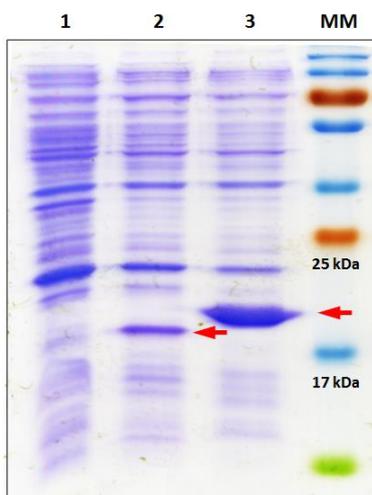


Figure 61 : Analyse par SDS-PAGE 15% et révélation au bleu de Coomassie R-250 de l'expression à 37°C des domaines C2 α et C2 β .

Piste 1 : Témoin négatif d'expression (cellules transformées par le vecteur vide); piste 2 : domaine C2 α ; piste 3 : domaine C2 β ; MM : marqueur de Masse Moléculaire. Les protéines attendues sont indiquées par une flèche rouge.

Ainsi, après optimisation des conditions d'induction, les bactéries transformées ont été cultivées à plus grande échelle puis lysées par sonication comme décrit dans la partie Méthodes (Cf. 2.2.3.1.). Les analyses ont, alors, démontré que les deux domaines étaient systématiquement exprimés dans les corps d'inclusion. En effet, aucune protéine n'a visiblement été détectée, ni dans la fraction soluble analysée par SDS-PAGE, ni après purification en conditions natives de cette fraction.

Par ailleurs, les PLDs étant des protéines associées à la membrane, l'hypothèse d'une interaction du domaine C2 seul avec la membrane d'*E. coli* a été étudiée. Pour cela, après expression du domaine C2 β , la fraction microsomale a été purifiée. Ainsi, l'analyse par immunoempreinte révèle qu'une faible portion de la protéine est soluble après ultracentrifugation à 100 000 x g (Figure 62B, piste 4') tandis que rien ne peut être détecté dans la fraction microsomale (Figure 62B, piste 5'). Enfin, la quasi-totalité du domaine C2 β est localisée dans les corps d'inclusion (Figure 62A, piste 1 et Figure 6B, piste 1'). Il n'a donc pas été possible de purifier les domaines C2 en conditions natives, c'est pourquoi, nous avons décidé de les purifier en conditions dénaturantes à partir des corps d'inclusion.

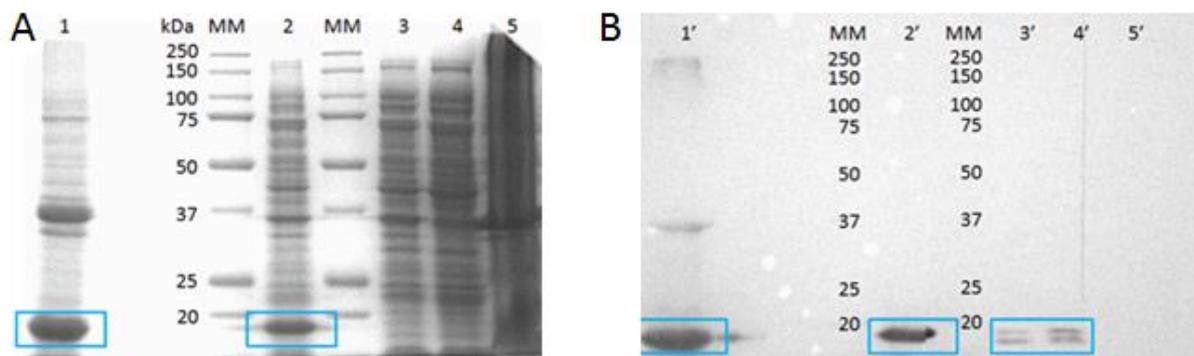


Figure 62 : Analyse par SDS-PAGE (A) et immunoempreinte (B) de la présence éventuelle du domaine C2 β dans la fraction microsomale. MM : marqueur de Masse Moléculaire ; piste 1 et 1' : débris cellulaires solubilisés avec 8 M d'urée ; piste 2 et 2' : fraction protéique obtenue à partir de cellules entières ; piste 3 et 3' : fraction soluble à 10 000 x g ; piste 4 et 4' : fraction soluble à 100 000 x g ; piste 5 et 5' : fraction microsomale. Les protéines attendues sont encadrées en bleu.

Pour cela, la concentration minimale d'urée nécessaire à la solubilisation des corps d'inclusion a été criblée. Il en résulte que les corps d'inclusion des domaines C2 α (Figure 63A, piste 6) et C2 β (Figure 63B, piste 5) se dissolvent à partir de 5 M d'urée. Ce résultat a ainsi été mis à profit, en lavant plusieurs fois les culots de débris cellulaires avec une concentration de 4 M d'urée. Ceci constitue une première étape de purification qui permet d'éliminer les protéines bactériennes tout en enrichissant les fractions insolubles en domaine C2.

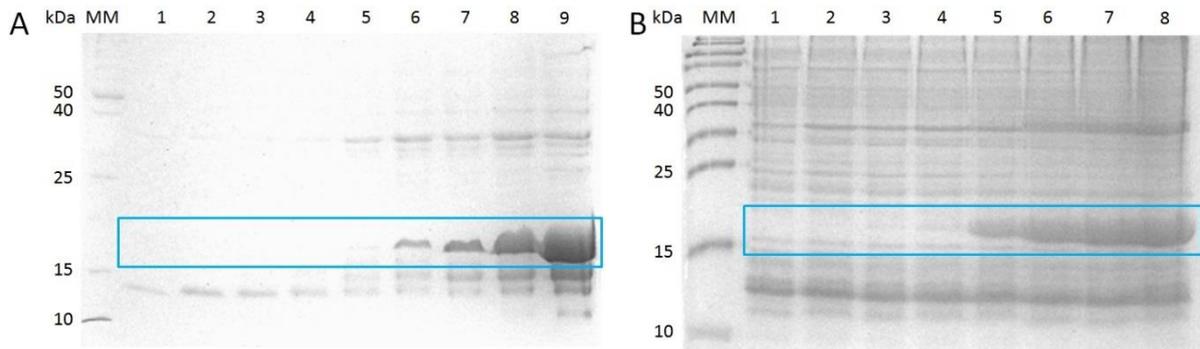


Figure 63 : Analyse par SDS-PAGE 15% et révélation au bleu de Coomassie R-250 du criblage de la concentration minimale d'urée nécessaire à la solubilisation des domaines C2 α et C2 β . (A) Solubilisation du domaine C2 α . Pistes 1 à 9 : corps d'inclusion repris avec une concentration croissante d'urée de 0 à 8 M (par palier de 1 M). (B) Solubilisation du domaine C2 β . Pistes 1 à 8 : corps d'inclusion repris avec une concentration croissante d'urée de 1 à 8 M (par palier de 1 M) ; MM : Marqueur de masse moléculaire. Les protéines attendues sont encadrées en bleu.

Finalement, après sédimentation des corps d'inclusion, les domaines C2 α et C2 β ont été solubilisés par une concentration de 8 M d'urée et purifiés en conditions dénaturantes par chromatographie d'affinité. La pureté des fractions d'élutions a ensuite été évaluée par SDS-PAGE avec révélation des protéines au bleu de Coomassie. Il en résulte que les domaines C2 α et C2 β (Figure 64) sont visiblement purs à homogénéité et migrent sous forme d'une seule bande avec une masse moléculaire estimée à 18 kDa pour le domaine C2 α et à 19 kDa pour le domaine C2 β (Figure 64). La quantité de protéine purifiée a été estimée à 17 mg par litre de culture pour le domaine C2 α et à 21 mg par litre pour le domaine C2 β .

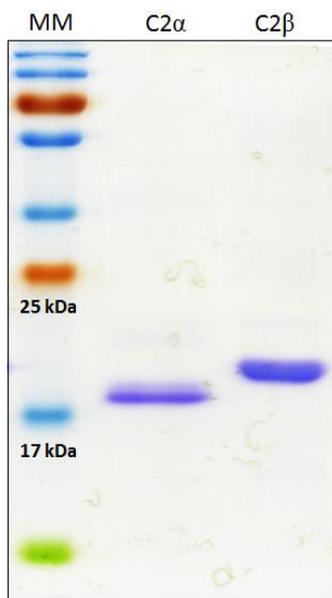


Figure 64 : Analyse par SDS-PAGE 15% et révélation au bleu de Coomassie R-250 des domaines C2 α et C2 β purifiés par chromatographie d'affinité. MM : Marqueur de masse moléculaire.

3.1.1.3. Renaturation des domaines C2 α et C2 β

Les domaines C2 α et C2 β ayant été purifiés en conditions dénaturantes, il a été nécessaire de les renaturer afin qu'ils puissent retrouver leur conformation biologique. Pour cela, la renaturation lente par dialyse a tout d'abord été expérimentée. Cependant, cette méthode n'a pas abouti aux résultats escomptés, les domaines C2 α et C2 β ayant totalement précipité. Ceci peut s'expliquer par la formation d'intermédiaires partiellement repliés qui s'agrègeraient lors d'une diminution lente en agent chaotropique (urée). Afin de pallier ce problème, la renaturation par dilution rapide des domaines C2 α et C2 β a été testée. En effet, ces deux protéines étant de faible taille (environ 170 résidus) et ne possédant pas de ponts disulfures, leur dilution à une concentration de 1 M final d'urée (non dénaturante) permet d'éviter la formation d'intermédiaires de renaturation. Cependant, bien qu'une faible agrégation ait été observée après dialyse, une précipitation totale des domaines C2 α et C2 β a été constatée lors de leur concentration. Ainsi, il n'a pas été possible d'obtenir les protéines à plus de 10 $\mu\text{g/mL}$, en l'absence d'urée. Afin de s'assurer de leur renaturation effective, leur fluorescence intrinsèque et leurs structures secondaires, par dichroïsme circulaire, ont été étudiées.

➤ **Suivi de la renaturation par fluorescence**

La fluorescence intrinsèque des protéines est l'une des méthodes les plus employées pour le suivi de la renaturation des protéines. Celle-ci se base sur l'utilisation des tryptophanes, qui possèdent un coefficient d'absorption molaire et un rendement quantique bien supérieur aux phénylalanines et aux tyrosines (Shen *et al.*, 2008). Par ailleurs, à l'inverse de ces résidus, la fluorescence des tryptophanes est sensible à l'environnement. En effet, les tryptophanes présentent un maximum d'excitation à 280 nm et réémettent généralement entre 310 et 350 nm, en fonction de la polarité de leur environnement (Shen *et al.*, 2008). Ainsi, lorsqu'ils sont exposés au solvant (cas des protéines dénaturées) les tryptophanes présentent une longueur d'onde d'émission de fluorescence vers 350 nm, tandis que lorsqu'ils sont enfouis au cœur des protéines (cas des protéines renaturées), ceux-ci présentent une diminution de leur longueur d'onde d'émission (généralement 330 nm). Cependant, lors d'une telle excitation, une faible population de tyrosines est tout de même excitée, bien que leur contribution soit peu significative (Shen *et al.*, 2008).

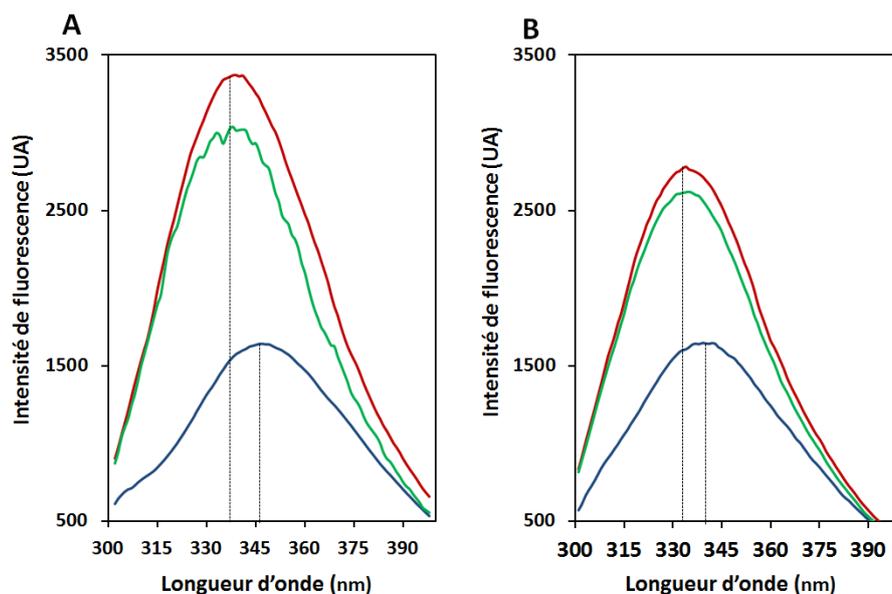


Figure 65 : Spectres d'émission de fluorescence, après excitation à 280 nm, des domaines C2 α (A) et C2 β (B), en présence de 8 M d'urée (spectre bleu), renaturés par dilution rapide (spectre rouge) et après ajout de 1 mM d'ions calcium (spectre vert). Les traits en pointillé indiquent le maximum d'émission. UA : unité arbitraire.

La fluorescence intrinsèque en conditions dénaturantes et non dénaturantes des domaines C2 α et C2 β , qui possèdent deux tryptophanes chacun, a donc été analysée (Figure 65). Pour cela, les deux protéines ont été diluées afin d'obtenir une concentration finale de 16 mM d'urée et une concentration de protéines comprise entre 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$. Ainsi, en présence de 8 M d'urée, le domaine C2 α présente un maximum d'émission de 346,0 nm (Figure 65A, courbe bleue) tandis que le domaine C2 β présente un maximum d'émission de 340,2 nm (Figure 65B, courbe bleue). Directement après dilution à 16 mM final d'urée, on observe un déplacement du maximum d'émission de 8,2 nm pour le domaine C2 α ($\lambda_{\text{max}} = 337,8$ nm, Figure 65A, courbe rouge) et de 6,5 nm pour le domaine C2 β ($\lambda_{\text{max}} = 333,7$ nm, Figure 65B, courbe rouge), accompagné d'une augmentation de leur intensité de fluorescence.

Ces résultats indiquent ainsi, qu'en présence de 8 M d'urée, les tryptophanes des deux domaines se trouvent dans un environnement polaire, tandis qu'à 16 mM d'urée, ces derniers s'enfouissent dans un environnement plus hydrophobe et plus contraint. Les différences observées démontrent, par conséquent, un changement global de conformation pour les deux protéines, avec un enfouissement des tryptophanes (Vivian *et al.*, 2001).

Par ailleurs, à 16 mM d'urée, l'ajout de Ca^{2+} dans le milieu provoque une diminution de l'intensité de fluorescence pour les deux protéines (Figure 65, spectre vert) tandis que leur maximum d'émission reste inchangé. Néanmoins, lors de l'ajout de concentrations croissantes de Ca^{2+} , l'intensité de fluorescence n'a pas varié de manière dose-dépendante, comme il l'a pu être décrit pour le domaine C2 de la cPLA₂ (Nalefski *et al.*, 1997). En effet,

les domaines C2 α et C2 β se sont comportés de manière similaire au domaine C2 de la PLD α de tomate (Tiwari *et al.*, 2011), suggérant que chez les domaines C2 de plantes, le Ca²⁺ n'induit pas de changement conformationnel équivalent à celui rapporté pour le domaine C2 de la cPLA₂. Néanmoins, une précipitation du domaine C2 α , qui se traduit sur le spectre (Figure 65A) par la diminution du rapport signal/bruit, est tout de même observée. Il est ainsi probable que le Ca²⁺ induise un réarrangement local des domaines C2, aboutissant à l'exposition des zones hydrophobes.

➤ **Suivi de la renaturation par dichroïsme circulaire**

Afin de compléter et de confirmer les résultats de fluorescence, la renaturation des deux domaines C2 a été étudiée par dichroïsme circulaire. Pour cela, les protéines ont été diluées comme précédemment et leur ellipticité molaire en fonction de la longueur d'onde a été mesurée. Bien que l'urée masque la zone inférieure à 200 nm, il est possible d'étudier la variation d'ellipticité molaire entre 205 et 250 nm.

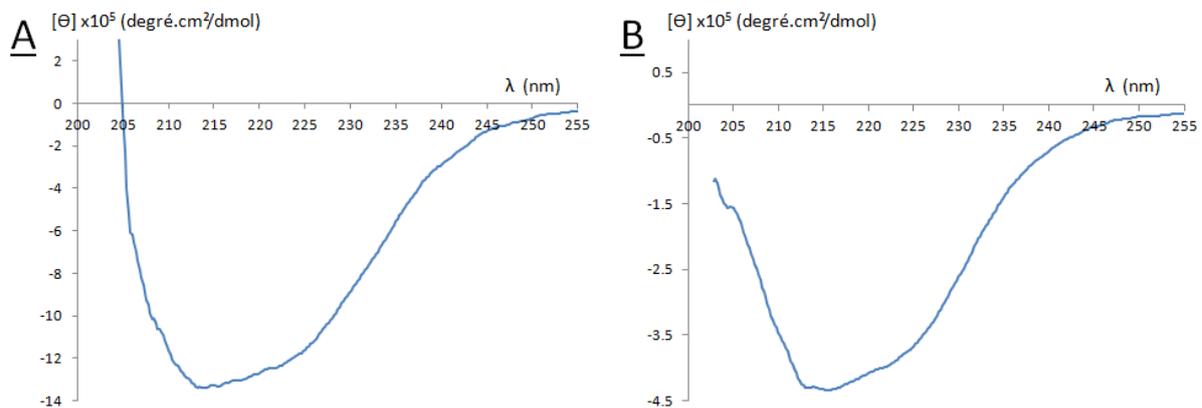


Figure 66 : Spectres de dichroïsme circulaire des domaines C2 α (A) et C2 β (B) renaturés par dilution rapide en présence de 50 mM d'urée.

On observe ainsi que le spectre du domaine C2 α (Figure 66A) présente un minimum d'ellipticité molaire à 214 nm tandis que celui du C2 β (Figure 66B) présente un minimum à 214,5 nm. Les deux spectres (Figure 66) présentent également un très faible épaulement vers 225 nm et tendent vers un maximum pour les faibles longueurs d'onde. Ainsi, ces résultats indiquent un repliement des protéines essentiellement en feuillet β avec une présence probable d'une faible portion en hélice α . Les domaines C2 α et C2 β semblent donc adopter un repliement principalement en feuillet β , lors de leur renaturation par dilution rapide. Ceci illustre parfaitement la structure des modèles types de domaines C2 et notamment celle de la cPLA₂ (Cf. 1.6.). Par ailleurs, ces résultats sont en adéquation avec les études de dichroïsme circulaire précédemment effectuées sur les domaines C2 des PLD d'*Arabidopsis thaliana*, qui présentent également une structure en feuillet β (Zheng *et al.*, 2000).

Ainsi, les résultats de dichroïsme circulaire, associés aux résultats de fluorescence intrinsèque, indiquent que les domaines C2 α et C2 β retrouvent une structure comparable à la conformation biologique attendue, permettant ainsi de caractériser leur interaction avec la membrane.

3.1.1.4. Analyse de l'interaction des domaines C2 avec les phospholipides

Les domaines C2 α et C2 β se repliant comme attendu, la caractérisation de leur affinité avec les phospholipides a été entreprise. Pour cela, la technique des lipides immobilisés sur membrane de PVDF a été utilisée. Cette technique utilise la propriété des phospholipides à se fixer sur un support hydrophobe *via* leurs chaînes acyles. Ainsi, après incubation avec la protéine cible, la révélation des interactions avec les phospholipides s'effectue à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette de la protéine ("dot-blot").

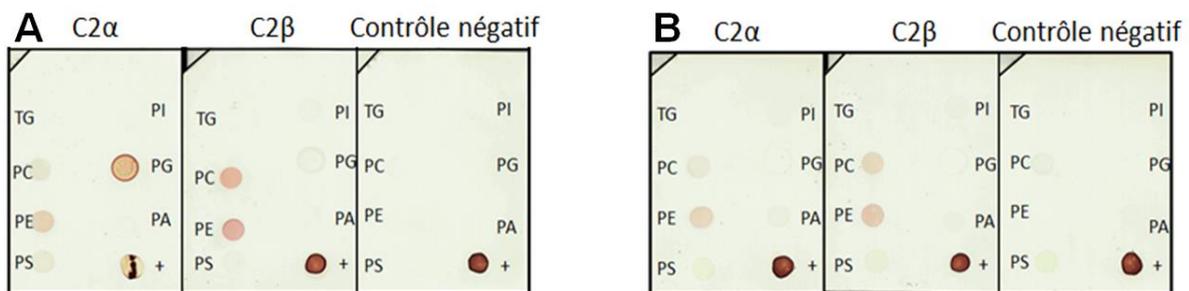


Figure 67 : Analyse par "dot-blot" de l'interaction des domaines C2 α et C2 β avec des lipides immobilisés sur une membrane de PVDF en l'absence (A) ou en présence (B) de 1 mM de Ca²⁺. L'interaction est révélée à l'aide d'un anticorps couplé à la HRP et dirigé contre l'étiquette 6xHis de ces domaines. Le contrôle négatif correspond à l'incubation des membranes de PVDF avec l'anticorps seul, sans les domaines C2. + : domaine C2 déposé directement sur la membrane.

Ainsi, comme le montre la figure 67, on observe que les domaines C2 α et C2 β fixent la PC et la PE que ce soit en absence (Figure 67A) ou en présence (Figure 67B) de Ca²⁺. Par ailleurs, il est aussi possible d'observer que le domaine C2 α , et dans une moindre mesure le C2 β , fixent le PG en absence de Ca²⁺ (Figure 67A), tandis qu'en présence de Ca²⁺ (Figure 67B), cette interaction semble abolie.

De manière intéressante, ces résultats contredisent le dogme classique d'une fixation Ca²⁺-dépendante des domaines C2 aux membranes, tel qu'il l'a été décrit pour les domaines C2 de la cPLA₂, de la PKC α et de la synaptotagmine (Cf. Figure 29). Néanmoins ces résultats sont en accord avec le profil de fixation aux membranes, décrit pour le domaine C2 α de tomate (Tiwari *et al.*, 2011), qui fixe les phospholipides de manière Ca²⁺-indépendante. Par ailleurs, la fixation observée sur le PG est lui aussi en accord avec les effets observés de ce phospholipide, qui agit comme un activateur de la PLD α de tournesol (Abdelkafi *et al.*, 2011b).

Par conséquent, afin d'approfondir ces résultats, la caractérisation des propriétés biochimiques des AtPLD α et - β s'avère nécessaire. En effet, la comparaison des propriétés biochimiques des domaines C2 seuls en relation avec les enzymes entières, permettra de comprendre leur implication dans la régulation des PLDs végétales.

3.1.1.5. Expression et caractérisation des AtPLD α et - β

À l'instar des domaines C2, les AtPLD α et - β ont été exprimées chez *E. coli*, après induction à l'IPTG, et analysées par SDS-PAGE par comparaison avec leur masse moléculaire théorique (Tableau 8).

Tableau 8 : Paramètres théoriques des AtPLD α et - β exprimées. aa : acides aminés.

Protéine	Nombre d'aa	Masse moléculaire (kDa)	pH isoélectrique
AtPLD α	821	93,0	5,68
AtPLD β	839	94,3	8,27

Néanmoins, aucune expression n'a pu être observée à 37°C pour l'AtPLD α (Figure 68A, piste 5) tandis que l'AtPLD β n'y est que faiblement exprimée (Figure 68A, piste 6). Par ailleurs, une protéine additionnelle d'environ 40 kDa est observée sur gel de polyacrylamide lors de l'expression de l'AtPLD β à 37°C (Figure 68A, piste 6). Celle-ci correspond probablement à une forme tronquée de la protéine. En effet, le plasmide pRIPL ne codant que pour deux des trois ARNt rares de l'arginine chez *E. coli*, la traduction de l'AtPLD β serait interrompue à cause d'une région riche en codon CGA (fréquent chez *A. thaliana*) entre les bases 972 et 1125. C'est pourquoi, afin de ralentir la vitesse de synthèse des protéines, l'induction a ensuite été réalisée à 20°C sur la nuit. Ainsi, comme le montre le profil de migration de la figure 68B, une expression des AtPLD α (Figure 68B, pistes 2 à 4) et AtPLD β (Figure 68B, pistes 5 à 7) a cette fois été constatée.

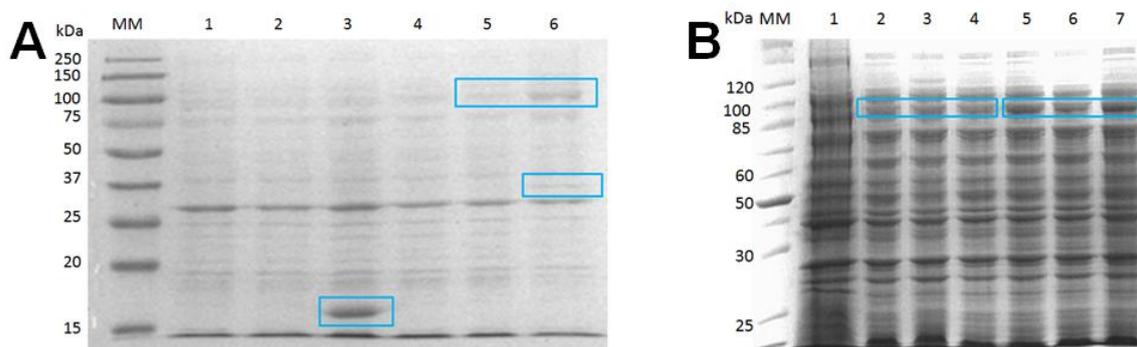


Figure 68 : (A) Analyses par SDS-PAGE 12% et révélation au bleu de Coomassie R-250 de l'expression à 37°C des PLD α et β . MM : marqueur de Masse Moléculaire ; piste 1 : témoins négatifs d'expression ; pistes 2 à 4 : domaine C2 α ; piste 5 : AtPLD α ; piste 6 : AtPLD β . (B) Analyse par SDS-PAGE 10% de l'induction de l'expression à 20°C des PLD α et β . MM : marqueur de Masse Moléculaire ; piste 1 : témoin négatif d'expression ; pistes 2 à 4 : expression de l'AtPLD α ; pistes 5 à 7 : expression de l'AtPLD β . Les protéines attendues sont encadrées en bleu.

Comme précédemment, après optimisation des paramètres d'induction, les bactéries transformées ont été cultivées à plus grande échelle, puis lysées par sonication et enfin, l'activité PLD a été testée. Cependant, aucune activité n'a pu être détectée, en utilisant le test chromogénique choline oxydase / peroxydase, laissant supposer que ces PLDs sont exprimées de manière non fonctionnelle. Ce phénomène peut être dû à la présence de l'étiquette 6xHis à l'extrémité carboxy-terminale des PLDs, qui empêche un repliement fonctionnel de ces enzymes, lors de l'expression. En effet, il a été précédemment rapporté que lors de l'expression recombinante en système bactérien des BoPLD α 1 et BoPLD α 2 (Schäffner *et al.*, 2002), l'addition d'une étiquette à ses extrémités amino- ou carboxy-terminales, aboutit à l'obtention d'une enzyme inactive. *A contrario*, l'expression en l'absence d'étiquette 6xHis a permis aux auteurs d'obtenir une enzyme active, suggérant ainsi que l'addition d'une étiquette empêche un repliement optimal de la PLD.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'expression de l'AtPLD α en l'absence d'étiquette 6xHis a été entreprise. Pour cela le gène codant l'enzyme a été cloné comme précédemment, mais additionné d'un codon stop en 3' du gène, situé en amont du site de restriction *NotI*. Ceci permet ainsi d'empêcher la fusion de l'AtPLD α avec l'étiquette 6xHis. Comme précédemment, une expression importante de l'AtPLD α est visible sur le profil de migration protéique, analysé par SDS-PAGE (Figure 69A), lors de l'induction à 20°C sur une nuit. Cependant, là encore, aucune activité PLD n'a pu être détectée pour cette construction, en utilisant le test chromogénique choline oxydase / peroxydase.

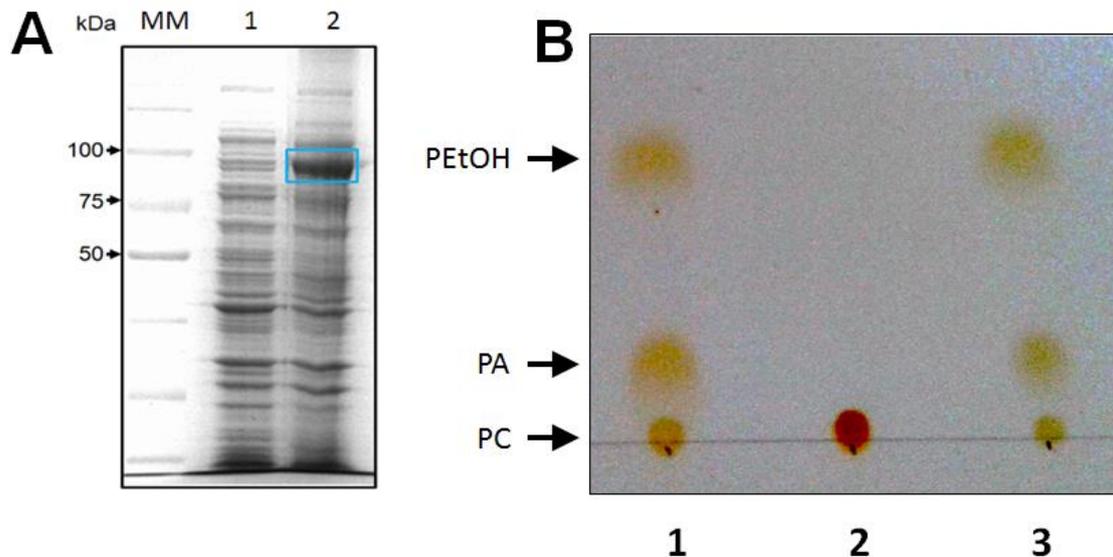


Figure 69 : (A) Analyse par SDS-PAGE 10% et révélation au bleu de Coomassie R-250 de l'induction de l'expression à 20°C de l'AtPLD α sans étiquette 6xHis. MM : marqueur de Masse Moléculaire ; piste 1 : témoin négatif d'expression (cellules transformées par le vecteur vide) ; piste 2 : expression de l'AtPLD α sans étiquette 6xHis. La protéine attendue est encadrée en bleu. (B) CCM de l'analyse de l'activité de l'AtPLD α exprimée sans étiquette 6xHis. Piste 1 : mélange (10 nmol de chaque composé) de témoins de migrations (PC, PA et PEtOH) ; piste 2 : réaction effectuée avec l'AtPLD α sans étiquette 6xHis ; piste 3 : témoins positifs (réaction effectuée avec la VuPLD α).

Ainsi, afin de confirmer ce résultat, l'activité transphosphatidylase de l'AtPLD α sans étiquette 6xHis a elle-aussi été testée. Pour cela, l'extrait cellulaire a été incubé en présence de PC mais également en présence d'éthanol, substrat pour la réaction de transphosphatidylation (Cf. 1.7.3.). Après réaction, les lipides ont été extraits et analysés par CCM. Cependant, comme le montre la figure 69B, aucune activité PLD n'est détectée pour l'AtPLD α sans étiquette 6xHis (Figure 69B, piste 2), tandis qu'avec le contrôle positif, la VuPLD α , on observe la formation de PA et de phosphatidyléthanol (PEtOH) (Figure 69B, piste 3).

Ainsi, bien qu'ils contrastent avec les résultats de Schäffner et collègues (Schäffner *et al.*, 2002), qui ont été en mesure d'exprimer les BoPLD α 1 et BoPLD α 2 de manière active en système bactérien, ces résultats indiquent néanmoins qu'*E. coli* ne constitue pas le système d'expression le plus approprié pour l'obtention de PLDs actives. En effet, *E. coli* est un système d'expression procaryote qui ne permet pas d'effectuer certaines modifications post-traductionnelles, qui sont nécessaires à la maturation des PLD α .

Néanmoins, en utilisant le système d'expression *P. pastoris*, Ben Ali et collègues (Ben Ali *et al.*, 2007), ont été en mesure d'exprimer de manière active la VuPLD α , ce qui est d'ailleurs confirmé par la figure 69B (piste 3). De manière intéressante, l'enzyme purifiée semble subir les mêmes modifications post-traductionnelles que chez la plante, telles que les glycosylations (Cf. 1.5.3.3.). Ainsi, à la vue des résultats obtenus, l'utilisation du système levure apparaît être une meilleure alternative que le système bactérien pour l'expression de l'AtPLD α .

3.1.2. Expression de l'AtPLD α chez *P. pastoris* et caractérisation

3.1.2.1. Clonage de l'AtPLD α dans le vecteur pGAPZB

La levure *Pichia pastoris* est un système d'expression qui présente plusieurs avantages par rapport à l'utilisation des systèmes bactériens. En effet, cette levure est un organisme eucaryote qui possède un système endomembranaire et qui est ainsi capable d'effectuer certaines modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation ou la maturation de peptides signaux. Ainsi *P. pastoris* est particulièrement adaptée à l'expression de protéines recombinantes d'origine eucaryote, glycosylées à l'état naturel. En effet, cette levure est notamment capable de reconnaître la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X représente n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline) qui constitue les sites de N-glycosylation chez les levures mais également chez les mammifères et chez les plantes (Strasser, 2016). Ainsi, *P. pastoris* permet de produire des protéines recombinantes présentant des glycosylations comparables à celles observées chez les plantes, le nombre de résidus osidiques ajoutés étant beaucoup plus faible que chez d'autres levures (Macauley-Patrick *et al.*, 2005), telles que chez *Saccharomyces cerevisiae* (50 à 150 résidus mannoses contre 5 chez *P. pastoris*).

Ainsi, les ADNc codant l'AtPLD α , en l'absence (AtPLD α -WT) ou en présence d'une étiquette 6xHis (AtPLD α -6xHis), ont été clonés dans le vecteur pGAPZB modifié (Cf. 2.2.1.), de la même manière que décrit précédemment (Cf. 3.1.1.1.). Après vérification des constructions par séquençage, les plasmides des deux constructions ainsi que le vecteur vide, servant de témoin négatif d'expression, ont été linéarisés afin de transformer *P. pastoris*, par recombinaison homologue. Ainsi, après transformation et sélection sur boîte, en présence de Zéocine, les clones recombinants ont été criblés par PCR afin de s'assurer de la présence des inserts.

Pour chaque construction, la PCR a été effectuée avec les amorces complémentaires du promoteur GAP, en amont du codon initiateur, et du domaine C2 pour l'AtPLD α -WT et l'AtPLD α -6xHis, ou bien avec les amorces complémentaires du promoteur GAP et du terminateur AOX1 du pGAPZB, pour le vecteur vide. Ainsi, les fragments de PCR obtenus sur les clones transformés, par le vecteur vide (Figure 70A, pistes 1 à 4) ou par les constructions contenant les inserts de l'AtPLD α -WT (Figure 70B, pistes 1 à 4) ou de l'AtPLD α -6xHis (Figure 70C, pistes 2 à 4), migrent aux tailles moléculaires attendues et sont correctement intégrés après le promoteur GAP.

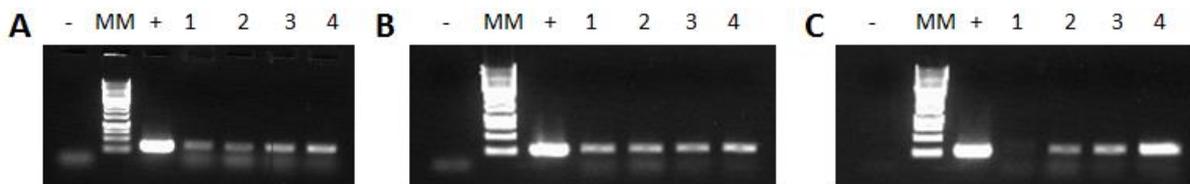


Figure 70 : Analyse sur gel d'agarose (1,5%) du criblage par PCR avec la Taq polymérase des clones recombinants transformés par le vecteur vide (A), l'AtPLD α -WT (B), ou l'AtPLD α -6xHis (C). MM : marqueur de taille moléculaire, pistes 1 à 4 : clones recombinants testés ; (- : *P. pastoris* non transformée ; (+) : pGAPZB contenant le gène d'intérêt.

3.1.2.2. Cinétique d'expression de l'AtPLD α chez *P. pastoris*

Afin d'étudier l'expression de manière fonctionnelle des deux formes de l'AtPLD α recombinante, AtPLD α -WT et AtPLD α -6xHis, les clones positifs pour la PCR ont été cultivés pendant plusieurs jours et leur activité PLD a été étudiée. Ainsi, comme le montre la figure 71A, les extraits bruts de *P. pastoris* transformés par l'AtPLD α -WT présentent des activités PLD bien supérieure au contrôle négatif d'expression.

Par ailleurs, l'expression au cours du temps de l'AtPLD α -WT présente une activité spécifique croissante en fonction du temps de culture (Figure 71B), atteignant un maximum au bout de 7 jours de culture. De manière intéressante, ce résultat contraste avec le profil d'expression de la VuPLD α , précédemment obtenue par Ben Ali et collègues (Ben Ali *et al.*, 2007), qui présentait une augmentation rapide de l'activité PLD, avec un maximum atteint au bout de 3 jours de culture. Néanmoins, ce résultat indique une expression fonctionnelle de l'AtPLD α -WT et confirme que *P. pastoris* est un système d'expression adapté à la production recombinante des PLD de plantes.

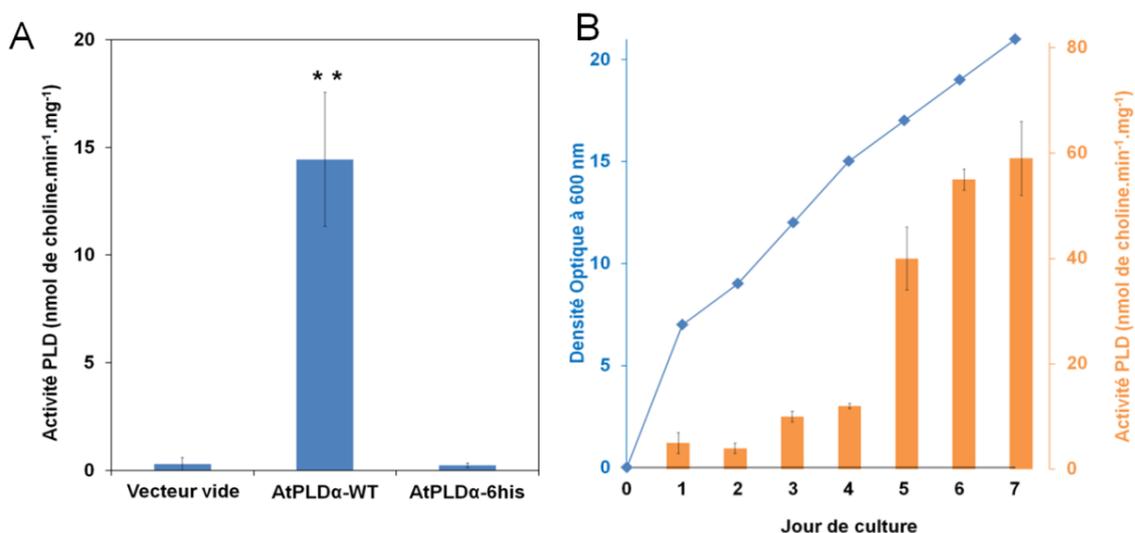


Figure 71 : (A) Activité PLD dans des extraits protéiques bruts de *Pichia pastoris* transformée par le vecteur vide ou exprimant l'AtPLD α -WT recombinante ou bien l'AtPLD α -6xHis, après 4 jours de culture. Les valeurs présentées sont les moyennes de \pm l'écart type obtenu à partir de quatre clones indépendants et positifs pour la PCR. ** P < 0,01 (par rapport au vecteur vide). (B) Mesure de l'activité PLD de *P. pastoris* transformée par le pGAPZB-AtPLD α -WT et de la densité optique à 600 nm, représentant sa croissance en fonction du temps de culture.

A contrario, dans les mêmes conditions expérimentales, aucune activité PLD n'a pu être observée dans des extraits bruts de *P. pastoris* transformée avec la séquence codant l'AtPLD α -6xHis (Figure 71A). Ceci suggère ainsi soit une mauvaise insertion génomique de l'ADNc, soit un mauvais repliement de la protéine en raison de la présence de l'étiquette 6xHis, comme il l'a été discuté précédemment (Cf. 3.1.1.5.). En effet, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Schöffner et collègues (Schöffner *et al.*, 2002), qui ont montré que, en utilisant les BoPLD α 1 et BoPLD α 2 recombinantes, l'ajout d'une étiquette à l'extrémité amino- ou carboxy-terminal aboutissait à l'obtention d'enzymes inactives. Par conséquent, il n'a pas été possible d'obtenir l'AtPLD α fusionnée à l'étiquette 6xHis, afin de la purifier par affinité. Néanmoins, bien que l'addition d'une étiquette représente une aide précieuse pour la purification des protéines, celle-ci n'est pas indispensable dans le cas de la purification des PLD α . En effet, comme introduit précédemment (Cf. 1.5.3.1.) les PLD α peuvent être purifiés par chromatographie hydrophobe, en présence de Ca²⁺.

3.1.2.3. Purification de l'AtPLD α et séquençage N-terminal

Afin de purifier l'AtPLD α -WT recombinante, nous avons utilisé sa propriété à se fixer sur des supports hydrophobes, tels que l'Octyl-Sépharose, en présence de Ca²⁺, comme précédemment rapporté (Abousalham *et al.*, 1993, Abousalham *et al.*, 1995, Ben Ali *et al.*, 2007, El Maarouf *et al.*, 2000, Lambrecht *et al.*, 1992, Sato *et al.*, 2000, Schöffner *et al.*, 2002, Schöps *et al.*, 2002). En effet, cette méthode de purification se base sur la fixation Ca²⁺-dépendante de la PLD sur l'Octyl-Sépharose, suivie d'une étape de lavage et enfin d'une étape d'éluion, par chélation du Ca²⁺ avec de l'EDTA.

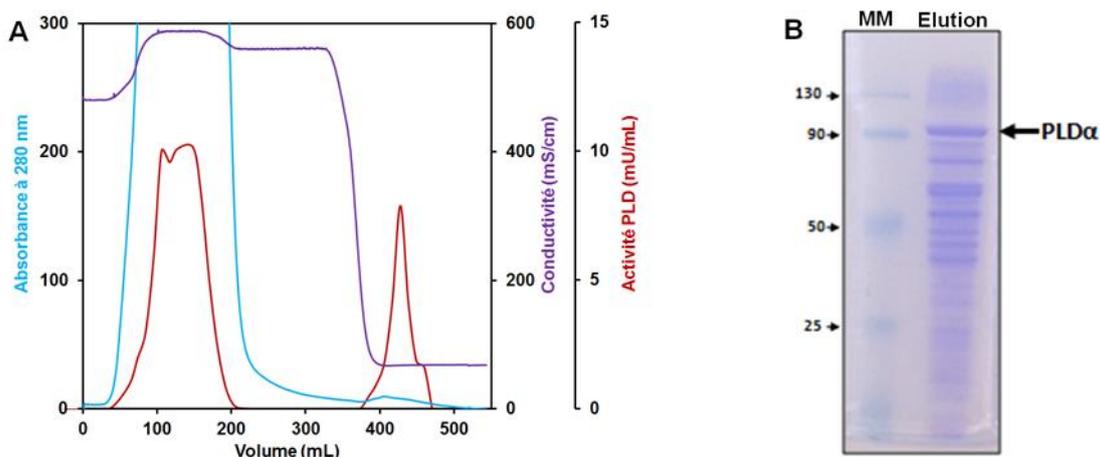


Figure 72 : (A) Chromatogramme de la purification sur colonne d'Octyl-Sépharose de l'AtPLD α -WT exprimée chez *P. pastoris*. (B) Analyse par SDS-PAGE (10%) et révélation au bleu de Coomassie R-250 des fractions d'éluion réunies et concentrées. MM : marqueur de Masse Moléculaire.

Ainsi, cette méthode a été utilisée pour purifier l'AtPLD α -WT, comme le montre le chromatogramme de la figure 72A, où l'on observe, pour les fractions 370 à 480, un pic d'activité PLD (Figure 72A, courbe rouge) concomitant au pic d'éluion des protéines, mesuré par l'absorbance à 280 nm (Figure 72A, courbe bleue). La chélation du Ca²⁺ par l'EDTA se traduit par une diminution de la conductivité (Figure 72A, courbe violette). Ainsi, l'AtPLD α -WT partiellement purifiée a été obtenue, comme l'atteste le profil de migration de la figure 72B, où l'on observe une bande protéique majoritaire, correspondant à une masse moléculaire d'environ 90 kDa.

Cependant, malgré un lavage intensif de la colonne d'Octyl-Sépharose durant le processus de purification, une proportion importante de protéines contaminantes a été éluee en même temps que l'AtPLD α -WT (Figure 72B). Néanmoins, la fraction étant grandement enrichie en PLD, la séquence N-terminale en acides aminés de l'AtPLD α -WT a été déterminée. Ainsi, comme le montre la figure 73, l'AtPLD α -WT présente la séquence NVEETIGV qui correspond aux positions 36 à 43 et qui se révèle être très similaire à la séquence N-terminale obtenue précédemment pour la VuPLD α recombinante exprimée chez *P. pastoris* (Ben Ali *et al.*, 2007).

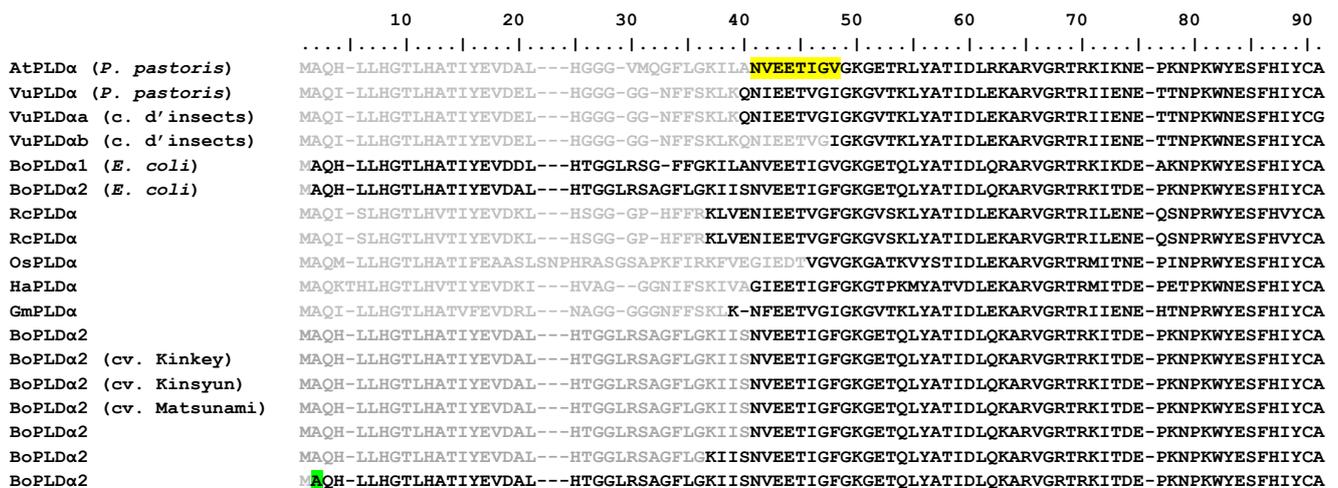


Figure 73 : Alignement des séquences protéiques des régions N-terminales de différentes PLD α purifiées. Les résidus colorés en gris représentent les séquences déduites des ADNc et absents dans les PLD matures (colorées en noir). Les résidus surlignés en jaune proviennent des résultats obtenus par séquençage (dégradation d'Edman) de l'AtPLD α recombinante tandis que le résidu acétylé est surligné en vert.

De manière intéressante, un grand nombre d'études a rapporté ce type de clivage pour différentes PLD α , purifiées à partir de tissus végétaux. En effet, ce phénomène a, de prime abord, été rapporté par Wang et collègues (Wang *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1994) pour la PLD α de *Ricinus communis* (RcPLD α) et puis décrit pour la PLD α issue d'*Oryza sativa* (OsPLD α) (Ueki *et al.*, 1995), *Glycine max* (GmPLD α) (Abousalham *et al.*, 1995), *Helianthus annuus* (HaPLD α) (El Maarouf *et al.*, 2000), ainsi que pour les BoPLD α 1 et BoPLD α 2 (Abousalham *et al.*, 1993, Sato *et al.*, 2000, Watanabe *et al.*, 1999) (Figure 73).

Cependant, lors d'une étude plus récente, Schöps et collègues (Schöps *et al.*, 2002) ont rapporté une acétylation du second résidu N-terminal de la BoPLD α 2 (Figure 73, résidu surligné en vert), qui pourrait expliquer pourquoi les tentatives de séquencer la partie N-terminale des PLD α de *Brassica napus* (BnPLD α) (Novotná *et al.*, 1999) et d'*Arachis hypogaea* (AhPLD α) (Nakazawa *et al.*, 2006) n'ont pas donné de résultat. En effet, ce type de modifications post-traductionnelles bloquent le processus de séquençage, lors de la dégradation d'Edman.

A contrario, l'expression de manière recombinante en système procaryote (chez *E. coli*) des BoPLD α 1 et BoPLD α 2 a abouti à la production d'enzymes entières (Schäffner *et al.*, 2002), seule la méthionine initiatrice étant retirée. Par conséquent, les auteurs ont suggéré que le clivage observé provenait d'une dégradation protéolytique au cours du processus de purification. Néanmoins, en utilisant le système cellules d'insecte (système eucaryote), El Maarouf et collègues (El Maarouf *et al.*, 2000) ont également rapporté la purification des deux formes de la VuPLD α recombinante avec des sites de clivage N-terminaux distincts (VuPLD α a et VuPLD α b). De manière intéressante, les deux formes se sont révélées être sécrétées dans le milieu de culture, malgré l'absence de fusion à un peptide signal de sécrétion, suggérant que la partie N-terminale des PLD α pourrait jouer le rôle de peptide de signal.

Ainsi, bien que le mécanisme exact de ce clivage ou de cette dégradation ait besoin de plus d'investigations, on peut supposer que ce phénomène est dû à l'action de certaines protéases au niveau du domaine C2 de la PLD α (Cf. 1.5.2.). En effet, Simoes et collègues (Simoes *et al.*, 2005) ont précédemment rapporté une interaction entre la PLD α de *Cynara cardunculus* (CcPLD α) et la cardosine A, une aspartate protéinase qui s'accumule dans les vacuoles de stockage protéique (Simoes *et al.*, 2005). De plus, cette interaction, spécifique, se produit avec le domaine C2 par l'intermédiaire de deux motifs RGD et KGE, présents dans la cardosine A, et conduit à une protéolyse du domaine C2 recombinant de la CcPLD α , lors de la dissociation du complexe (Simoes *et al.*, 2005).

Néanmoins, il est important de noter que lors de cette étude, les auteurs n'ont pas déterminé le(s) site(s) d'hydrolyse(s) sur le domaine C2. En effet, ces expériences ont été effectuées par co-précipitation de la cardosine A avec le domaine C2, fusionné à une étiquette GST (glutathion S-transférase) à son extrémité N-terminale. La présence des protéines a alors été révélée par immuno-marquage à l'aide d'anticorps dirigés contre la cardosine A et l'étiquette GST, respectivement. L'hydrolyse observée par les auteurs pourrait, ainsi, provenir d'une hydrolyse totale du domaine C2 mais également de l'hydrolyse de sa partie N-terminale, telle qu'observée dans la figure 73, aboutissant alors à la perte de l'étiquette GST.

Par conséquent, ce peptide pourrait être retiré par l'action d'aspartate protéinases, telles que la cardosine A qui, de manière intéressante, présente des homologues non seulement chez *A. thaliana* mais également chez *P. pastoris*. En effet, *A. thaliana* possède trois aspartate protéinases, APA1 (AT1G11910), APA2 (AT1G62290) et APA3 (AT4G04460), dont deux présentent les motifs RGD et KGE, responsables de l'interaction avec les domaines C2 des PLD α . Par ailleurs, *P. pastoris* présente également des homologues de la cardosine A, tels que la Protéinase A (C4R6G8_PICPG) et la sous-unité catalytique SEC11 (SEC11_PICPG) de la peptidase du signal. Néanmoins, l'analyse *in silico* de la séquence peptidique de la Protéinase A indique que cet homologue présente un motif KGE inversé (EGK), ne lui permettant alors pas d'interagir avec la PLD α . *A contrario*, la sous-unité catalytique SEC11, qui est impliquée dans l'hydrolyse des peptides signaux d'entrée dans le système endomembranaire, présente quant à elle, un motif RGD et un motif KGD, capables d'interagir avec la PLD α , à l'instar de la cardosine A.

Par ailleurs, l'interaction de la CcPLD α avec la cardosine A suggère également que les PLDs de type α présentent une localisation vacuolaire. Ceci confirme ainsi les résultats de fractionnement cellulaire et de microscopie électronique qui montraient une localisation de la PLD α dans plusieurs compartiments cellulaires, tels que le cytosol, le RE, la mitochondrie ainsi que la vacuole (Cf. 1.5.2.). Ainsi, ces données de localisation cellulaire, associées au phénomène de sécrétion observé en cellules d'insecte (Cf. 1.6.3.) ainsi qu'aux profils de N-glycosylations des PLDs (Cf. 1.5.3.3.) constituent un faisceau de présomption quant à la présence d'un peptide signal en position N-terminale du domaine C2. Ce peptide serait alors retiré lors du processus de maturation dans le système endomembranaire.

Cependant, l'analyse *in silico* de la séquence peptidique des PLD α ne révèle pas la présence de la séquence canonique des peptides signaux d'entrée dans le système endomembranaire, reconnus par la particule de reconnaissance du signal (SRP). Ceci indique, par conséquent, que l'adressage de la PLD α vers le RE s'effectuerait de manière post-traductionnelle, *via* son interaction avec des protéines chaperonnes (Johnson *et al.*, 2013). En effet, bien que ce mécanisme de transport ne soit pas encore totalement caractérisé, celui-ci permettrait le transport de protéines cytosoliques, dont le peptide signal n'est pas suffisamment hydrophobe (Johnson *et al.*, 2013), vers le système endomembranaire, chez les mammifères (Lakkaraju *et al.*, 2012), chez les plantes (Paul *et al.*, 2013) ainsi que chez les insectes (Muller *et al.*, 1987) et chez les levures (Panzner *et al.*, 1995). Dans ce cas, l'adressage de la PLD α vers le système endomembranaire pourrait être régulé par l'acétylation de son second résidu, connu pour inhiber la translocation des protéines au RE, dans ce type de mécanisme (Forte *et al.*, 2011).

Néanmoins, bien que cette explication reste hypothétique, une autre question, concernant l'impact d'un tel clivage sur la PLD et *a fortiori*, sur le domaine C2, peut être posée. C'est pourquoi, nous avons décidé de poursuivre la caractérisation des domaines C2 en étudiant leur fonctionnalité sous leur forme mature.

3.1.3. Caractérisation des domaines C2 matures

3.1.3.1. Expression et purification des C2 α et C2 β matures

Bien que la nature exacte du clivage de la partie N-terminale des PLD α reste énigmatique, nous nous sommes interrogés sur l'impact d'un tel clivage sur la fonctionnalité des domaines C2. Ainsi, afin d'approfondir la compréhension de ce phénomène, nous avons exprimé et étudié les propriétés biochimiques des formes matures du domaine C2 α (mC2 α) et de son domaine C2 β équivalent (mC2 β), identifié par alignement des séquences protéiques, à titre de comparaison.

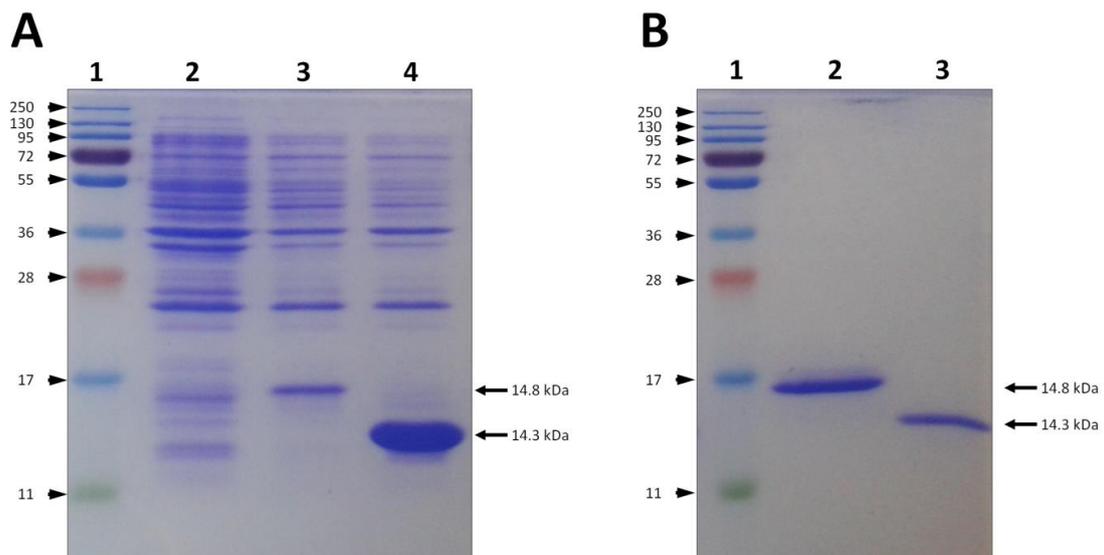


Figure 74 : (A) Analyse par SDS-PAGE 15% et révélation au bleu de Coomassie R-250 de l'expression à 37°C des domaines mC2 α et mC2 β . Piste 1 : marqueur de Masse Moléculaire ; piste 2 : témoin négatif d'expression (vecteur vide) ; piste 3 : domaine mC2 α ; piste 4 : domaine mC2 β . (B) Analyse par SDS-PAGE 15% et révélation au bleu de Coomassie R-250 des domaines mC2 α et mC2 β purifiés par chromatographie d'affinité. Piste 1 : marqueur de Masse Moléculaire ; piste 2 : domaine mC2 α ; piste 3 : domaine mC2 β .

Ainsi, l'analyse par SDS-PAGE de l'expression des mC2 α (Figure 74A, piste 3) et mC2 β dans BL21 (Figure 74A, piste 4) montre une accumulation rapide des deux domaines dans les corps d'inclusion, comme décrit précédemment (Cf. 3.1.1.2.). Par conséquent, les domaines mC2 α et mC2 β ont été solubilisés en conditions dénaturantes puis purifiés par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés. Ainsi, l'analyse par SDS-PAGE des mC2 α et mC2 β purifiés montre que ces protéines migrent sous la forme d'une seule

bande protéique avec des masses moléculaires de 14,8 (Figure 74B, piste 2) et 14,2 kDa (Figure 74B, piste 3), correspondant aux domaines mC2 α et mC2 β , respectivement.

3.1.3.2. Renaturation des C2 α et - β matures

Comme décrit précédemment, les domaines C2 purifiés peuvent être renaturés par dilution rapide dans un tampon ne contenant pas d'urée puis dialysés, afin d'éliminer l'urée. Cependant, dans ce cas aussi, les tentatives de concentration des deux domaines par ultrafiltration ont conduit à une précipitation de 80 à 90% des deux domaines C2, aboutissant à un rendement de renaturation d'environ 10 à 20%. L'addition de réactifs chimiques, tels que l'arginine (Tsumoto *et al.*, 2004) ou la N-lauroylsarcosine (Tao *et al.*, 2010), se sont avérés améliorer considérablement la solubilité des protéines, bien que les deux domaines C2 soient sujets à l'agrégation lors de la dialyse subséquente. Dans ces conditions expérimentales, la concentration maximale pouvant être obtenue a été de 5 μ M (7 μ g.mL⁻¹) pour le mC2 α et 9 μ M (13 μ g.mL⁻¹) pour le mC2 β .

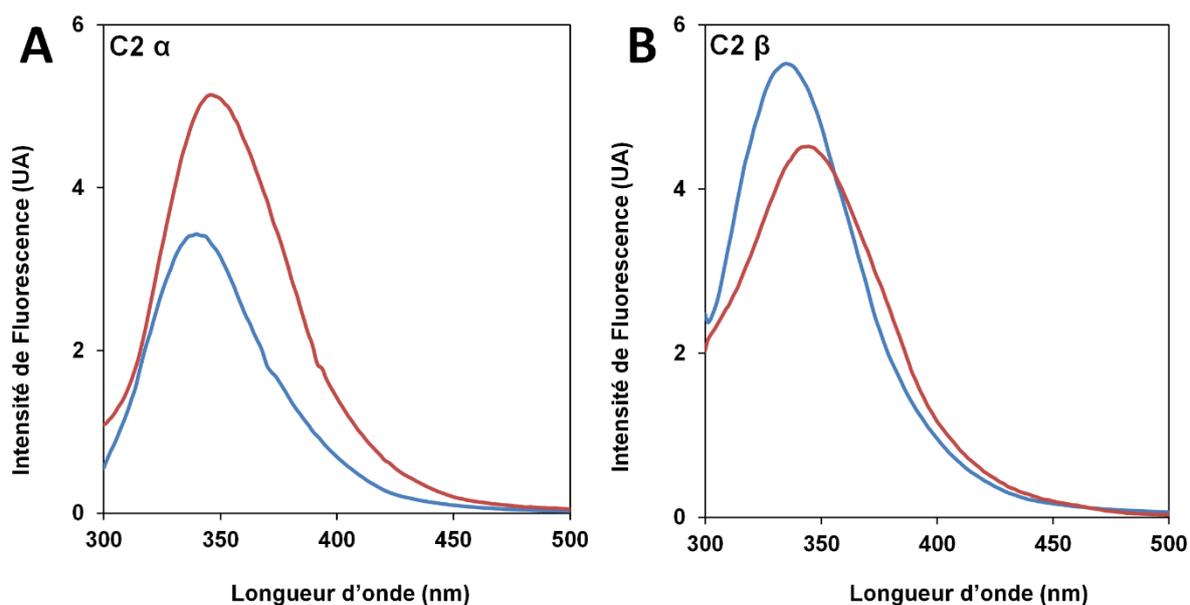


Figure 75 : Spectres de fluorescence intrinsèque (λ_{exc} 280 nm) des domaines mC2 α (A) et mC2 β (B) dilués dans un tampon Tris / HCl contenant 8 M d'urée (courbes rouges) ou sans urée (courbes bleues) et après 1 h d'incubation, à température ambiante. La concentration finale de ces deux domaines a été fixée à 1 μ M, conduisant à une concentration finale d'urée allant de 50 mM à 75 mM pour les courbes bleues. L'intensité de fluorescence est exprimée en unités arbitraires (UA) et les largeurs des bandes ont été fixées à 10 nm pour l'excitation et l'émission.

En dépit de la faible concentration de protéine obtenue, le processus de repliement de ces domaines a pu être suivi en utilisant leur fluorescence intrinsèque. Ainsi, en présence de 8 M d'urée, les deux domaines C2 dénaturés présentent une différence de leur maximum d'émission de fluorescence, correspondant à un λ_{max} de 349 nm pour le mC2 α (Figure 75A, courbe rouge) et un λ_{max} de 345 nm pour le mC2 β (Figure 75B, courbe rouge). Par ailleurs, lors de la réduction de la concentration d'urée, les deux domaines présentent un décalage de

leur maximum d'émission de fluorescence vers le bleu, avec une variation de leur intensité de fluorescence. En effet, comme on peut l'observer sur la figure 75, le mC2 α présente un maximum d'émission de fluorescence à un λ_{\max} de 340 nm avec une diminution concomitante de son intensité (Figure 75A, courbe bleue) tandis que le mC2 β présente un maximum d'émission à λ_{\max} de 335 nm avec une augmentation de son intensité de fluorescence (Figure 75B, courbe bleue).

Néanmoins, on peut tout de même noter, qu'à l'inverse du domaine C2 α (Cf. Figure 65A), le mC2 α présente une diminution de son intensité de fluorescence, lors du processus de renaturation. Ce phénomène peut s'expliquer par l'interaction de l'un de ses tryptophanes avec des résidus acides tels que les aspartates ou les glutamates. En effet, en plus de la polarité de leur environnement, les tryptophanes sont également sensibles à l'état de protonation de résidus acides proches, qui aboutit à un phénomène d'extinction de fluorescence, tel que décrit par Pokalsky et collègues (Pokalsky *et al.*, 1995) pour la Tyrosyl Phosphatase bovine.

Ainsi, les deux domaines présentent une diminution de leur longueur d'onde maximale d'émission d'environ 10 nm, lors de la réduction de la concentration d'urée. Comme discuté précédemment (Cf. 3.1.1.3.), ce phénomène est habituellement associé à un enfouissement des résidus tyrosine et tryptophane dans un environnement plus hydrophobe, indiquant un repliement des protéines étudiées (Vivian *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent, par conséquent, que les mC2 α et mC2 β sont capables de se replier, comme cela a été le cas pour les domaines C2 α et C2 β (Cf. 3.1.1.3.).

3.1.3.3. Analyse de l'interaction des domaines C2 matures avec les phospholipides

Afin de caractériser l'impact de la perte de leur partie N-terminale, la fixation de manière Ca^{2+} -dépendante ou -indépendante des mC2 α et mC2 β sur les phospholipides a été examinée, en utilisant la technique des lipides immobilisés, telle qu'effectuée précédemment (Cf. 3.1.1.4.). Ainsi, comme représenté sur la figure 76A, les deux domaines se lient clairement aux phospholipides anioniques (PS et PA) en présence de 1 mM de Ca^{2+} . À l'inverse, le mC2 α semble se fixer fortement sur le PG en l'absence de Ca^{2+} , tandis qu'une diminution de l'affinité est observable, lors de l'addition de Ca^{2+} .

Ces résultats ont ensuite été confirmés par des expériences de FRET, en utilisant des liposomes marqués au dansyl-PE (Figure 76B). Dans ces expériences, les tryptophanes servent de donneurs de fluorescence, qui est ensuite transférée à l'accepteur dansyle, lors de la fixation des domaines C2 aux vésicules phospholipidiques. Ainsi, comme le montre la figure 76B, les deux domaines C2 se lient aux phospholipides anioniques (PA et PS) en présence de Ca^{2+} , de manière similaire aux expériences effectuées avec les lipides immobilisés (Figure 76A). À l'inverse, aucune fixation n'est observée pour les phospholipides zwitterioniques (PC et PE), que ce soit en présence ou en l'absence de Ca^{2+} .

De manière intéressante, en l'absence de Ca^{2+} , les deux domaines C2 présentent une forte fixation aux vésicules de PG, qui ne semble pas être influencée par l'addition de Ca^{2+} . De même, une légère fixation aux vésicules de PS ainsi qu'une fixation beaucoup plus prononcée aux vésicules de PA peut être observée pour les deux domaines C2, en l'absence de Ca^{2+} (Figure 76B). Cependant, à l'inverse des vésicules de PG, l'addition de Ca^{2+} semble améliorer la fixation de ces deux domaines C2 aux vésicules de PA et de PS (Figure 76B). Néanmoins, par rapport au mC2 α , le mC2 β semble nécessiter une plus faible concentration de Ca^{2+} , afin de se fixer aux vésicules de PS.

Ainsi, contrairement aux résultats obtenus précédemment (Cf. 3.1.1.4.) et ceux rapportés pour le domaine C2 de la PLD α de tomate (Tiwari *et al.*, 2011), ces résultats sont en accord avec les données rapportées par Zheng et collègues (Zheng *et al.*, 2000), qui a démontré que les domaines C2 α et C2 $\beta^{\Delta 173-190}$ (Cf. 1.6.3.) étaient capables de se lier, *in vitro*, aux vésicules de PS, d'une manière Ca^{2+} -dépendante (Zheng *et al.*, 2000). Par ailleurs, de manière similaire aux résultats présentés dans la figure 76B, les auteurs ont également trouvé que le domaine C2 $\beta^{\Delta 173-190}$ exigeait une plus faible concentration de Ca^{2+} que le domaine C2 α , afin de se fixer aux vésicules de PS.

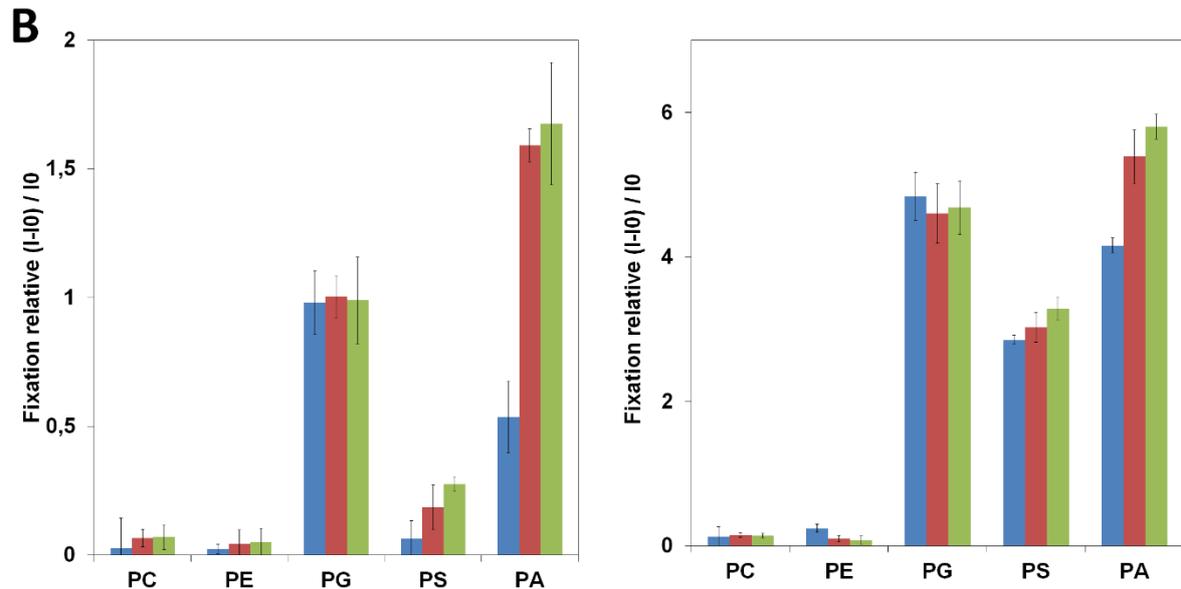
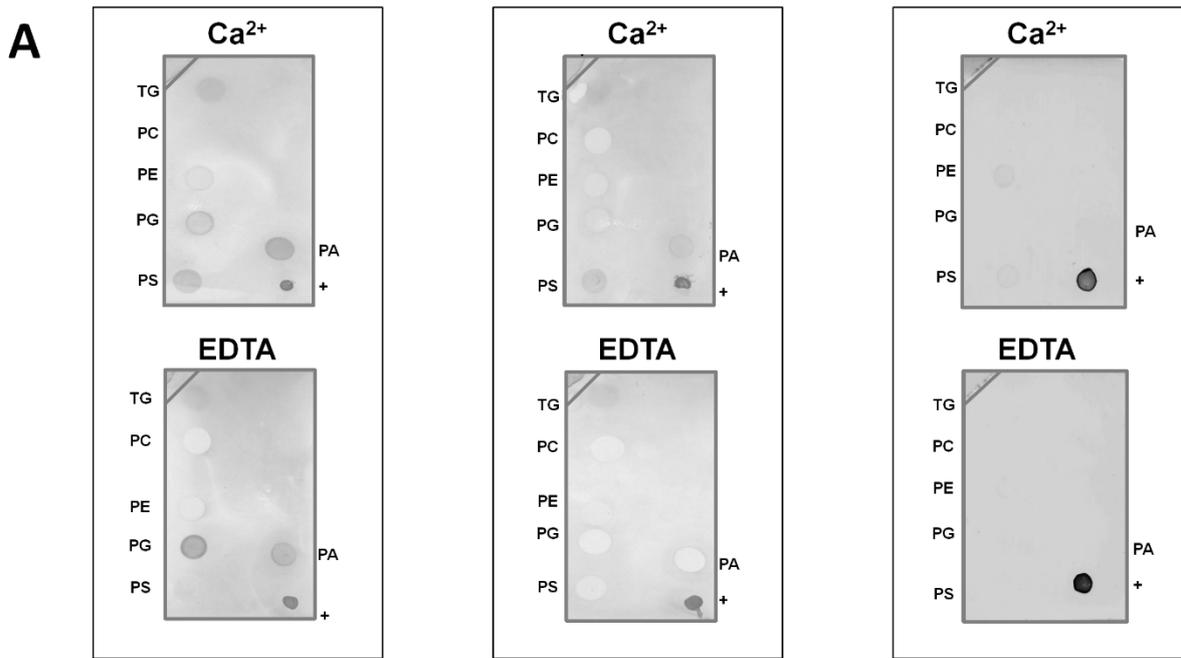


Figure 76 : (A) Analyse par "dot-blot" de l'interaction des domaines mC2 α (panneau de gauche) ou mC2 β (panneau du milieu) avec des lipides immobilisés sur une membrane de PVDF en présence de 1 mM de Ca²⁺ ou de 1 mM d'EDTA, en comparaison avec le contrôle négatif (panneau de droite). Le contrôle négatif correspond à l'incubation des membranes de PVDF avec l'anticorps seul (en l'absence de domaines C2). Les lipides ont été déposés sur une membrane de PVDF et les interactions ont été révélées, après incubation avec les domaines C2, en utilisant un anticorps anti-6xHis couplé à la HRP, comme décrit dans la partie Méthode. TG : triglycérides, + : contrôle positif réalisé en immobilisant les domaines C2 fusionnés à l'étiquette 6xHis. (B) Analyse de la fixation relative des domaines mC2 α (panneau de gauche) et mC2 β (panneau de droite) aux vésicules phospholipidiques, par FRET. Barres bleues : en absence de Ca²⁺, barres rouges : 50 μ M de Ca²⁺, barres vertes : 200 μ M de Ca²⁺. Les valeurs présentées sont les moyennes de \pm les écart-types obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

Cette fixation Ca^{2+} -dépendante des domaines C2 à la PS a ainsi été proposée comme étant impliquée dans le recrutement des PLDs aux membranes, de manière similaire au domaine C2 de la PKC α (Verdaguer *et al.*, 1999). Par ailleurs, les fixations des mC2 α et mC2 β aux vésicules de PA et de PG, présentées dans la figure 76, sont également en accord avec les données précédemment rapportées sur l'activation de la BoPLD α par le PA et le PG (Kuppe *et al.*, 2008), ainsi que sur l'activation de la HaPLD α par le PG (Abdelkafi *et al.*, 2011b). De plus, ce comportement a également été démontré par Majd et collègues (Majd *et al.*, 2013) qui ont ainsi proposé un nouveau modèle de cinétique interfaciale pour la PLD, en tenant compte du rôle auto-activateur du PA généré par la PLD (1.7.2.).

Concernant les fixations Ca^{2+} -indépendantes du PG, ces résultats suggèrent la présence d'un second site de fixation aux membranes. Ce second site de fixation pourrait correspondre au motif polybasique, précédemment identifiée comme motif de fixation au PIP $_2$ (Zheng *et al.*, 2000). En effet, comme il a été démontré sur la structure 3D du domaine C2 de la PKC α (Guerrero-Valero *et al.*, 2009), ce motif présente plusieurs résidus basiques, dans le brin β 3, qui ensemble, forment un "patch" chargé positivement, permettant ainsi la liaison aux phospholipides anioniques, tel qu'indiqué dans la figure 32 (Cf. 1.6.2.). De plus, ce second site peut également expliquer la légère fixation Ca^{2+} -indépendante des domaines mC2 α et mC2 β aux vésicules de PS et de PA de manière similaire au domaine C2 de la PKC α (Cf. 1.6.2., Figure 32).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent ainsi qu'à l'inverse des domaines C2 complets, les domaines C2 matures sont, quant à eux, capables d'interagir de manière Ca^{2+} -dépendante avec les phospholipides membranaires. Il apparaît donc que le peptide retiré, lors du processus de maturation, influence le caractère Ca^{2+} -dépendant de la fixation des domaines C2 aux membranes. Ainsi, ce peptide présente probablement une structure particulière, qui peut être étudiée *in silico*.

3.1.4. Prédiction des structures secondaires et modélisations 3D des domaines C2α et -β

Concernant la structure des domaines C2α et C2β, ceux-ci devraient présenter les 8 brins β conservés qui caractérisent la structure générale des domaines C2 et comme en témoigne la prédiction de leur structure secondaire (Figure 77). Cependant, tous les domaines C2 des PLDs de plantes présentent, en plus, une région supplémentaire située entre les deux brins β1 et β2 prédits. En effet, cette caractéristique singulière repose sur une insertion de 15 à 20 résidus qui ont été décrits précédemment (Zheng *et al.*, 2000) comme adoptant une structure en hélice α, ce qui est en accord avec la prédiction proposée (Figure 77).

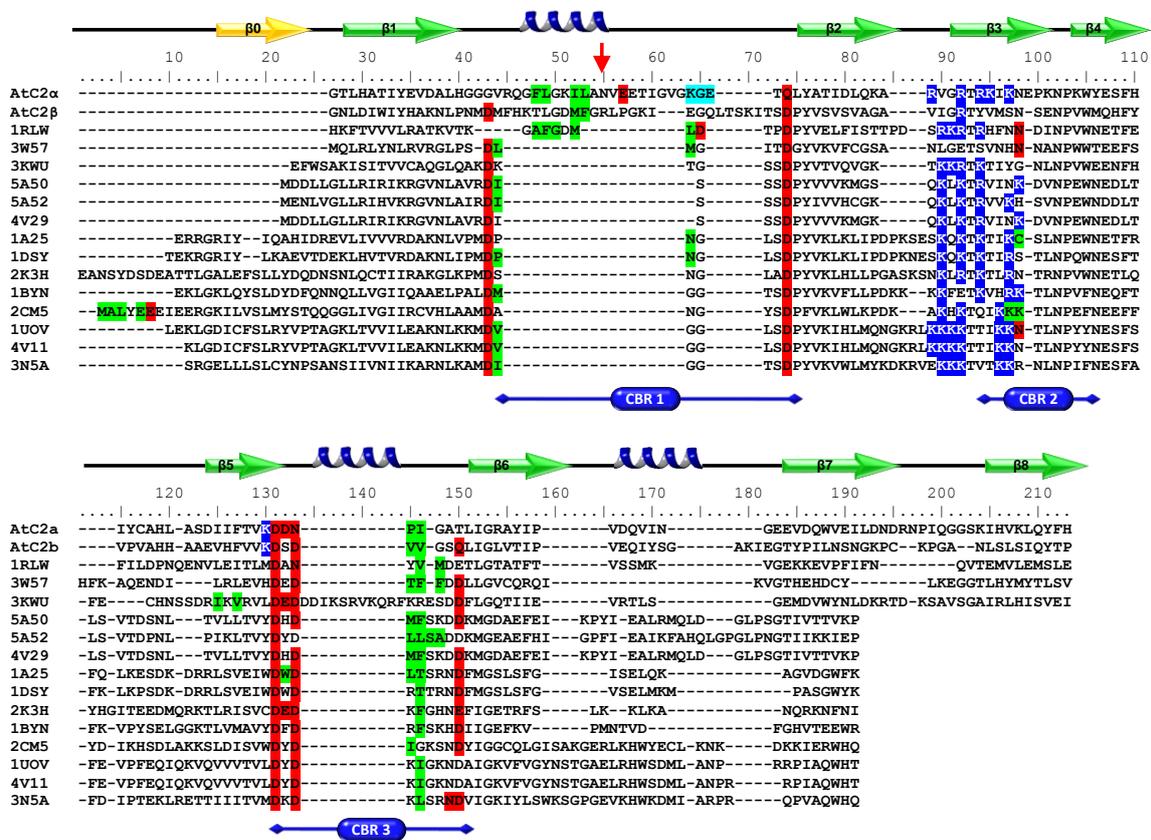


Figure 77 : Prédiction des structures secondaires des mC2α et mC2β, dont les séquences protéiques sont alignées contre les séquences de domaines C2 de structures connues. Les résidus surlignés en rouge représentent les résidus fixant le Ca²⁺, extraits des structures 3D, tandis que les résidus de fixation aux membranes, extraits de la base de données OPM, sont surlignés en vert. L'hélice α prédite entre les brins β1 et β2 est indiquée en bleu. Le brin β0, coloré en jaune, correspond au premier brin β présent dans la typologie I. Le site de clivage observé pour l'AtPLDα-WT est indiqué par une flèche rouge.

De plus, d'une manière intéressante, le clivage observé sur l'AtPLDα recombinante semble se produire à la fin de l'hélice prédite, indiquée par une flèche sur la figure 77, ce qui suggère que cette région pourrait être exposée à la surface du domaine C2. Ainsi, afin de

vérifier cette hypothèse, les structures 3D des domaines C2 α et C2 β ont été modélisées, sur la base de la prédiction de leur structure secondaire. En effet, bien que le BLAST sur la *Protein Data Bank* ait permis d'identifier plusieurs structures présentant des séquences similaires à celles des domaines C2 α et C2 β , les taux d'identités n'ont pas été suffisant pour effectuer une modélisation par homologie. Il a donc été nécessaire d'utiliser des serveurs spécialisés, afin de modéliser leur structure par analogie. En effet, à l'inverse de la modélisation par homologie, la modélisation par analogie se base sur l'alignement des structures secondaires, qui sont beaucoup plus conservées que les séquences. Cette méthode permet ainsi d'identifier des protéines « empreintes » non homologues, mais qui présentent un enchaînement de structures secondaires similaires, permettant alors une modélisation 3D des protéines cibles.

Ainsi, le serveur *Geno3D* (Combet *et al.*, 2002) a proposé la structure 2R83 (Tableau 9) comme structure empreinte pour les deux domaines mais n'a, cependant, pas été capable d'effectuer les modélisations désirées, les valeurs d'alignement des structures secondaires n'étant pas suffisantes (Zemla *et al.*, 1999). Les serveurs *Phyre* (Kelley *et al.*, 2009) et *I-Tasser* (Yang *et al.*, 2015) ont, quant à eux, sélectionné les structures 1GMI, 1WFJ, 2R83 et 2EP6 (Tableau 9) comme structures empreintes pour la modélisation des deux domaines. Néanmoins, le serveur *Phyre* n'a pas été en mesure de modéliser la boucle supplémentaire du CBR1 des deux domaines (Cf. Figure 77) tandis que le serveur *I-Tasser* a, quant à lui, pallié ce problème *via* une modélisation *ab-initio*.

Tableau 9 : Structures empreintes sélectionnées par les serveurs *Geno3D*, *Phyre* et *I-Tasser* pour modéliser par analogie la structure des domaines C2 α et C2 β .

Structure empreinte	Pourcentage d'identité		Nom (espèce) de la protéine empreinte
	Domaine C2 α	Domaine C2 β	
1GMI	19%	21%	Domaine C2 de la PKC ϵ (<i>R. rattus</i>)
1WFJ	21%	21%	At1g63220 (<i>A. thaliana</i>)
2R83	26%	24%	Domaine C2 de la synaptotagmin 1 (<i>H. sapiens</i>)
2EP6	18%	22%	Second domaine C2 de la MCTP2 (<i>H. sapiens</i>)

Un seul modèle, parmi les cinq proposés par *I-Tasser*, a été retenu pour la suite de la modélisation des domaines C2 α et C2 β , en fonction des C-scores obtenus et de l'adéquation des modèles avec une signification biologique. Le C-score est un score de confiance qui permet d'estimer la qualité des modèles. Il se base notamment sur la qualité de l'alignement structural des modèles contre les structures empreintes utilisées. Celui-ci est généralement compris entre -5, pour les modèles peu fiables, et 2 pour les modèles de qualité. Ainsi, le modèle obtenu pour le domaine C2 α présente un C-score de 0,22 contre -0,05 pour le C2 β . Ces valeurs reflètent le faible taux d'homologie obtenu par BLAST mais révèlent, néanmoins, une modélisation assez fiable. Par ailleurs, les modèles sélectionnés

présentent, après affinement de leur structure, une distribution de leurs angles ϕ et ψ proche d'une réalité biochimique, comme l'indiquent les diagrammes de Ramachandran (Figure 78) avec plus de 90% de résidus présents dans les zones favorisées.

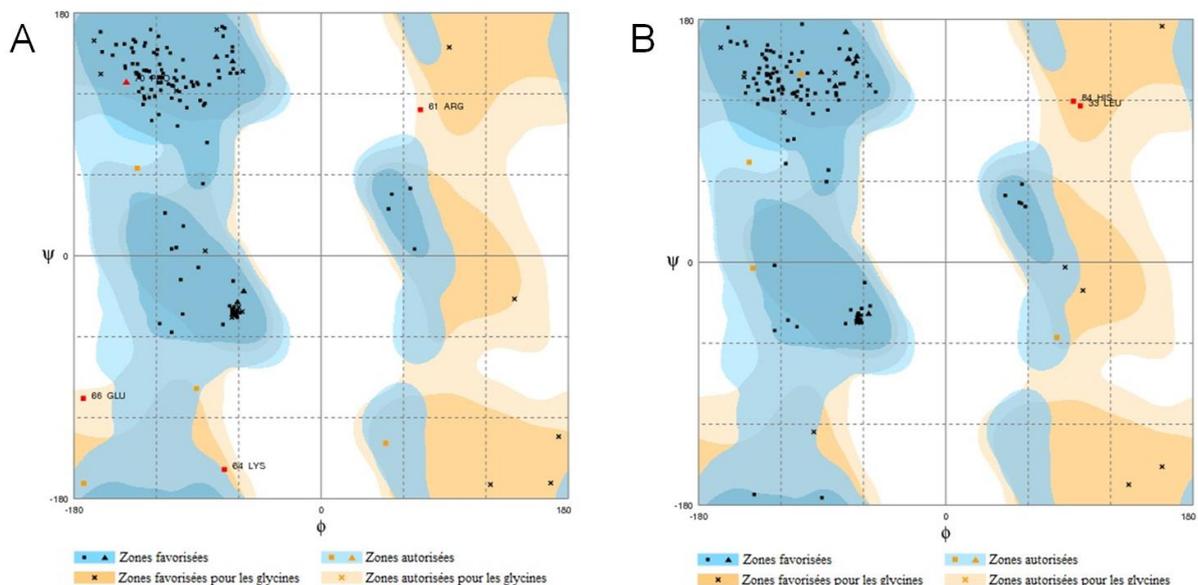


Figure 78 : Diagrammes de Ramachandran pour les modèles structuraux des domaines C2 α (A) et C2 β (B). Les résidus présents dans les zones favorisées sont colorés en noir, ceux dans les zones autorisées sont en orange et les résidus dans les zones interdites sont colorés en rouge (prolines : \blacktriangle , glycines : x, autres résidus \blacksquare).

Ainsi, les deux modèles sélectionnés (Figure 79 A et B) présentent une structure similaire aux structures de référence, décrites dans la littérature (Cf. 1.6.). En effet, ils présentent tous deux un repliement en sandwich β , composé de 8 brins β antiparallèles qui forment deux feuillettes antiparallèles, tandis que leur boucle supplémentaire est modélisée en hélice α , tel que précédemment prédit (Cf. Figure 77).

De manière intéressante, ces hélices semblent adopter un motif amphipathique, présentant leur côté hydrophobe vers l'extérieur (Figure 79 A et B), d'une manière similaire à l'hélice présente dans la structure du domaine C2 de la cPLA₂ (Cf. Figure 30) (Perisic *et al.*, 1998). En effet, dans cette structure, la partie hydrophobe de l'hélice permettrait d'ancrer le domaine C2 de la cPLA₂ à la membrane, l'hélice étant, par ailleurs, directement suivie par le premier résidu D liant le Ca²⁺ (Perisic *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les alignements structuraux avec diverses structures connues de domaines C2, confirment que les deux domaines modélisés présentent une structure conforme à celle attendue, permettant ainsi d'ajouter les atomes de Ca²⁺, *in silico*, et de prédire les résidus des CBRs, capables de fixer le Ca²⁺. Ainsi, comme le montre la figure 79, les domaines C2 α et C2 β présentent les résidus D conservés du CBR3 (D97 et D98 pour le C2 α et D109 et D111 pour la C2 β). En revanche, ces domaines présentent des différences pour les résidus composant leur CBR1. En effet, tandis que le C2 β possède les résidus

conservés D au sein de son CBR1 (D34 et D62, Figure 77 et Figure 79B), le C2 α présente, quant à lui, une substitution D \rightarrow Q (Q49, Figure 77 et Figure 79A).

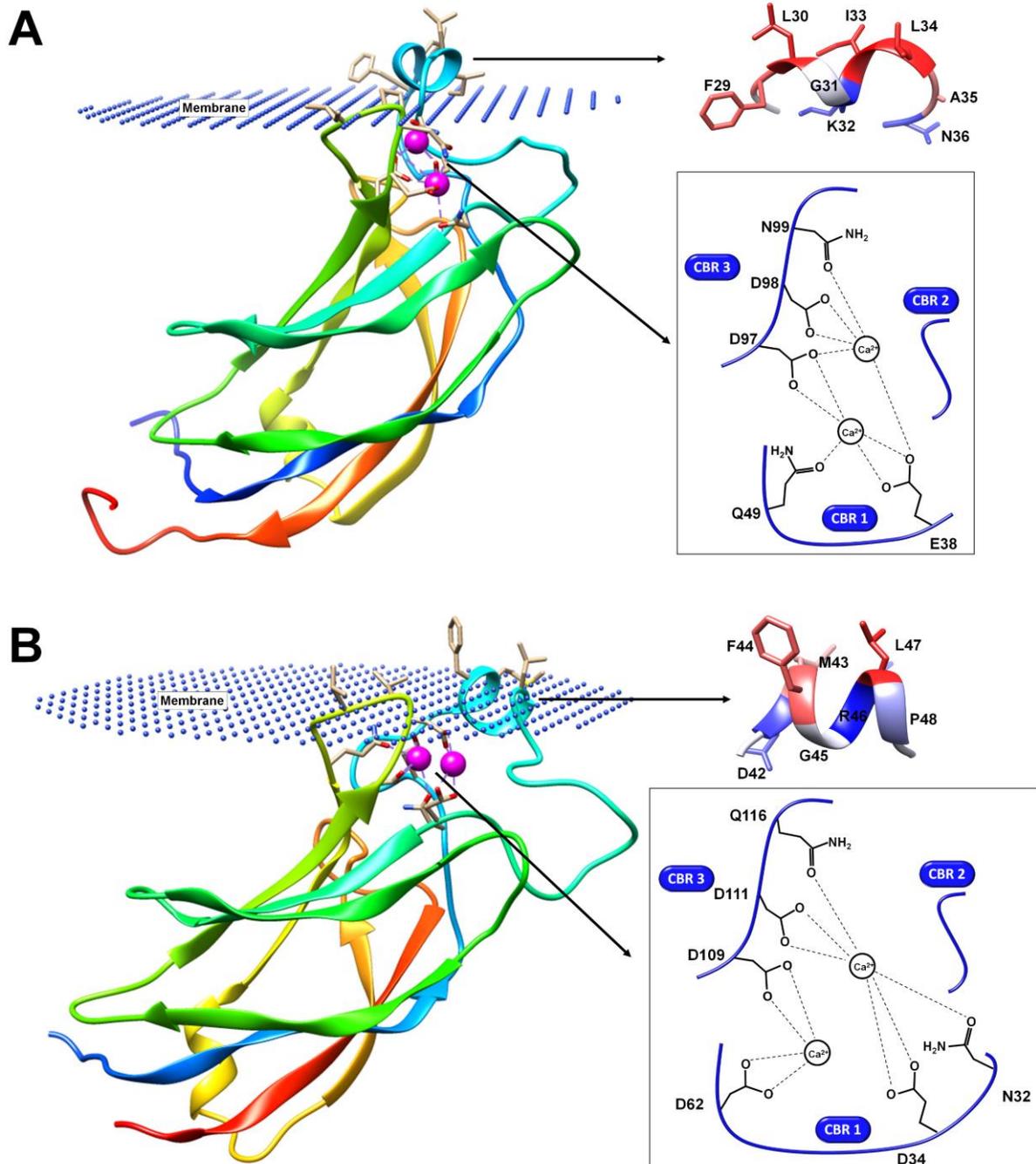


Figure 79 : Modèles proposés pour la structure des domaines C2 α (A) et C2 β (B), en utilisant le serveur I-tasser et fixé à la membrane en utilisant le serveur PPM (Cf. 2.2.6.6.). Les structures sont représentées en mode « ribbon » et colorées de l'extrémité N-terminale (bleu) à l'extrémité C-terminale (rouge). Les atomes de Ca²⁺ sont colorés en rose. Les encadrés représentent l'arrangement schématisé des résidus composant les CBRs et fixant les atomes de Ca²⁺.

Toutefois, la modélisation du C2 α permet de révéler un nouveau site d'interaction avec le Ca²⁺, pour ce domaine. En effet, le premier résidu glutamyl (E38) du motif "NVEE" apparaît, dans le modèle, comme étant capable de lier le Ca²⁺. Par ailleurs, ce résidu se situe juste après l'hélice α (Figure 77), de manière similaire au CBR1 du domaine C2 de la cPLA₂ (Perisic *et al.*, 1998), suggérant ainsi, que le C2 α présente un CBR1 fonctionnel.

De plus, ce résidu apparaît hautement conservé parmi les PLDs de type α (Cf. Figure 73) et reste présent dans la forme mature de l'enzyme, ce qui pourrait expliquer la nécessité d'une chélation complète du Ca²⁺ pour l'élution de la PLD de la colonne d'Octyl-Sépharose. Cette constatation est, par ailleurs, conforme aux données précédemment rapportées sur la VuPLD α produite en cellules d'insecte (El Maarouf *et al.*, 2000). Dans ce système d'expression, la VuPLD α présente des sites de clivage N-terminaux distincts, associés à des propriétés différentes de fixation sur l'Octyl-Sépharose en présence de Ca²⁺.

En effet, la forme purifiée après 3 jours d'infection (VuPLD $\alpha\alpha$) présente une séquence N-terminale similaire à la VuPLD α exprimée et purifiée dans *P. pastoris* et nécessite une chélation totale du Ca²⁺ afin d'être éluée de la colonne d'Octyl-Sépharose (El Maarouf *et al.*, 2000). *A contrario*, la forme purifiée après 4 jours d'infection (VuPLD $\alpha\beta$) présente, quant à elle, un clivage de 8 résidus supplémentaires et qui comprend le nouveau site de fixation au Ca²⁺ prédit. De manière intéressante, à l'inverse de la VuPLD $\alpha\alpha$, la VuPLD $\alpha\beta$ est éluée en présence de seulement 30 mM de Ca²⁺, indiquant que cette isoforme est moins sensible au Ca²⁺ et qui suggère ainsi que le CBR1 de son domaine C2 est affecté (El Maarouf *et al.*, 2000).

3.1.5. Conclusion

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les domaines C2 des PLDs de plantes présentent une hélice α en position N-terminale. Le caractère amphipathique de cette hélice α , identifié *in silico*, serait ainsi responsable d'une interaction Ca^{2+} -indépendante des domaines C2 avec les membranes. Néanmoins, l'hydrolyse des 35 premiers résidus N-terminaux des PLD α conduirait à la perte de cette propriété, aboutissant ainsi à une fixation Ca^{2+} -dépendante des domaines C2 aux membranes. En effet, il apparaît qu'à l'inverse des domaines C2 complets, les domaines C2 matures sont, quant à eux, capables d'interagir de manière Ca^{2+} -dépendante avec les phospholipides anioniques. Il semble donc que le peptide retiré influence le caractère Ca^{2+} -dépendant de la fixation des domaines C2 aux membranes.

Bien que la nature exacte du mécanisme d'hydrolyse de la partie N-terminale reste énigmatique, celui-ci pourrait provenir d'un processus de maturation des PLD α , suite à leur expression. En effet, les PLD α ayant été rapportées comme étant glycosylées et localisées dans plusieurs compartiments cellulaires, tels que le RE et la vacuole, l'hypothèse d'un transit *via* le système endomembranaire permettrait d'expliquer ce phénomène. Dans ce cas, le clivage de l'extrémité N-terminale des PLD α , par certaines protéases du système endomembranaire ou de la vacuole, pourrait servir de mécanisme d'activation lors d'un stress cellulaire. Cependant, cette explication reste hypothétique et nécessite d'être approfondie.

Enfin, bien que le suivi des activités PLD ait été rendu possible par l'utilisation du test chromogénique choline oxydase / peroxydase, ce test avait néanmoins révélé ses limites en termes de sensibilité et de mise en œuvre. En effet, bien que ce test soit adapté à la mesure des activités de PLDs pures, il a, néanmoins, nécessité la mise en place de contrôles supplémentaires, lors de son utilisation avec des extraits cellulaires bruts. Ces extraits cellulaires contiennent diverses molécules, telles que la choline, capables d'interagir avec la choline oxydase ou la peroxydase, aboutissant ainsi à de possibles artefacts expérimentaux, lorsque les contrôles adéquats ne sont pas mis en place. C'est pourquoi, la suite de ce manuscrit sera dédiée au développement d'une nouvelle méthode de mesure des activités PLD, capable de pallier cette faiblesse.

3.2. Mise au point d'une méthode directe et continue de dosage de l'acide phosphatidique généré par la phospholipase D.

3.2.1. Problématique

Bien que de nombreuses méthodes permettant la mesure des activités PLD aient été décrites à ce jour, celles-ci présentent plusieurs limites en termes de mise en œuvre, de sensibilité ou encore de spécificité de détection. A titre d'exemple, le test utilisant des substrats radiomarqués est de loin la méthode de mesure de l'activité PLD la plus utilisée. En effet, celle-ci est sans conteste la plus sensible et la plus polyvalente, permettant de mesurer de faibles variations d'activité et ce, aussi bien *in vitro*, que directement sur des cellules en culture. Néanmoins, l'utilisation de la radioactivité est laborieuse et oblige la mise en place de moyens matériels dédiés à son utilisation. Par ailleurs, ce test utilisant la radioactivité est discontinu. En effet, son application à la mesure de l'activité PLD requiert, pour chaque dosage, une séparation préalable des produits de leurs substrats et par conséquent, augmente drastiquement le nombre de prises d'essais.

Ainsi, afin d'outrepasser le caractère laborieux du test utilisant la radioactivité, diverses méthodes de dosages en continu, par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie, ont été développées. Celles-ci se basent sur l'utilisation de substrats synthétiques, tels que le phosphatidyl-*p*-nitrophenol, ou bien sur l'utilisation d'enzymes couplées. Bien que moins sensibles que les tests utilisant la radioactivité, ces méthodes possèdent l'avantage d'être simples, facile à mettre en œuvre et présentent la possibilité d'utilisation en plaque de microtitration pour la mesure de l'activité PLD en routine. Cependant, en dépit de leurs qualités, chacune de ces deux méthodes possède son lot d'inconvénients. Ainsi, l'utilisation de substrats synthétiques limite grandement les études de caractérisations biochimiques en empêchant, notamment, la détermination des paramètres cinétiques intrinsèques à chaque PLD, vis-à-vis de leurs substrats naturels. Par ailleurs, les chromophores ou les fluorochromes qui constituent les chaînes acyles ou les têtes polaires de ces phospholipides peuvent induire un encombrement stérique important et ainsi empêcher une prise en charge optimale du substrat par le site actif de l'enzyme.

Dans le cas où le phospholipide substrat contient de la choline, celle-ci, libérée dans le milieu, peut être dosée spectrophotométriquement *via* une cascade enzymatique, faisant intervenir la choline oxydase et la peroxydase. Cependant, il est important de noter que l'utilisation de cette méthode requiert la mise en place de contrôles supplémentaires afin de s'assurer que l'activité observée ne provient pas d'artefacts. En effet, de tels phénomènes peuvent notamment se produire lors de la mesure d'activité PLD à partir d'extraits cellulaires qui contiennent naturellement de la choline à l'état libre. De surcroît, la dénaturation des échantillons par la chaleur peut, quant à elle, induire la formation de peroxydes, capables de réagir avec la peroxydase, et comme précédemment, peut biaiser les dosages. Enfin, à

l'instar des phospholipides synthétiques, l'emploi d'enzymes couplées pour le dosage de l'activité PLD se trouve restreint à l'utilisation d'un seul type de substrat, le plus souvent la PC. Ceci empêche, par conséquent, de déterminer la préférence de substrat des différents types de PLD, vis-à-vis de la tête polaire des phospholipides.

Ainsi, la solution la plus simple pour pallier ce problème réside dans le dosage du PA généré par l'action de la PLD, puisque celui-ci est invariablement produit lors de la réaction d'hydrolyse. Cependant, ce dernier apparaît comme beaucoup plus difficile à doser, car insoluble dans les tampons aqueux. Néanmoins, plusieurs groupes ont tout de même été capables de développer des méthodes de dosage du PA. Celles-ci se basent sur sa capacité à fixer les ions Fe^{3+} , faisant une compétition avec l'acide salicylique, ou bien sur le dosage du phosphate inorganique, généré lors de son hydrolyse par une phosphatase alcaline. Ces méthodes permettent ainsi d'étudier la spécificité de substrat de la PLD, vis-à-vis de la tête polaire, mais présentent, néanmoins, les inconvénients d'être indirects et discontinus.

Par conséquent, il apparaît que la majorité des tests disponibles, à ce jour, ne permettent d'effectuer que des dosages indirects et en point final ou bien sont restreints à l'utilisation d'un seul type de phospholipide substrat. C'est pourquoi, le développement d'une méthode de dosage du PA de manière directe et continue revêt un caractère fondamental, dans les études et les caractérisations cinétiques des PLDs. Pour cela, la détection du groupement phosphate du PA *via* l'utilisation de la 8HQ apparaît être la solution la plus adaptée. En effet, comme introduit précédemment (Cf. 1.8.5.3.), la 8HQ est capable de détecter de manière directe et spécifique les groupements phosphates, grâce à sa propriété d'amplification de fluorescence par chélation. Ainsi, afin d'évaluer l'utilisation potentielle de la 8HQ, en tant que sonde membranaire pour le suivi des activités PLD, sa capacité à détecter et à quantifier le PA a tout d'abord été évaluée.

3.2.2. Détection du PA par la 8HQ

3.2.2.1 Interaction de la 8HQ avec le PA

La 8HQ ayant été décrite dans la littérature comme étant capable de fixer les groupements phosphates, par l'intermédiaire d'ions métalliques (Cf. 1.8.5.3.), nous avons tout d'abord voulu étudier son comportement vis-à-vis du PA, le produit de la réaction d'hydrolyse catalysée par la PLD. Pour cela, les ions calcium ont été choisis en tant qu'ions métalliques, ceux-ci étant des activateurs de la PLD α de plantes, à une concentration de 20 mM (Cf. 1.5.3.2.). Par ailleurs, la fluorescence de la 8HQ a été examinée en présence de PA, sous forme de liposomes mais également sous forme de micelles mixtes, en présence de détergents. En effet, il a précédemment été démontré que l'addition de détergents permettait de former un substrat optimal pour la PLD, ceux-ci ayant la capacité de solubiliser efficacement les phospholipides (Cf. 1.5.3.2.).

Par ailleurs, la 8HQ présente deux longueurs d'onde maximales d'excitation à 270 nm et à 366 nm, conduisant toutes deux à une émission de fluorescence maximale à 490 nm. Cependant, les expériences suivantes ont été effectuées en excitant la 8HQ à 366 nm, afin d'éviter toute interférence potentiellement induite par la fluorescence intrinsèque des protéines. En outre, la concentration de la 8HQ a été fixée à 66 μ M afin de maintenir l'absorbance de la solution inférieure à 0,05 et de fournir des mesures fiables, en évitant tout effet de filtre interne (Valeur, 2001).

Dans ces conditions, la 8HQ présente une augmentation de son intensité de fluorescence à 490 nm en présence de liposomes constitués uniquement de PA, par rapport au contrôle négatif réalisé sans lipide, comme on peut l'observer sur la figure 80. Ceci indique, ainsi, que le PA est capable d'induire une augmentation de l'intensité de fluorescence de la 8HQ, en présence de Ca²⁺. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène serait que le PA soit capable de chélater le Ca²⁺, grâce aux deux charges négatives de son groupement phosphate, lui permettant par conséquent d'interagir avec la 8HQ et d'aboutir, *in fine*, au phénomène d'amplification de fluorescence par chélation.

Par ailleurs, le même comportement est observable pour les micelles mixtes composées de PA en présence de SDS ou de NaTDC, par rapport à leurs contrôles sans PA (Figure 80). Ces résultats apparaissent intéressants puisque le SDS et le NaTDC sont des détergents chargés négativement qui possèdent respectivement des groupements sulfates et carboxylates. Ceux-ci sont donc théoriquement capables de former un complexe avec le Ca²⁺ et *a fortiori*, avec la 8HQ. Néanmoins, ces deux détergents ne présentent qu'une seule charge négative et sont, par conséquent, incapables de chélater le Ca²⁺.

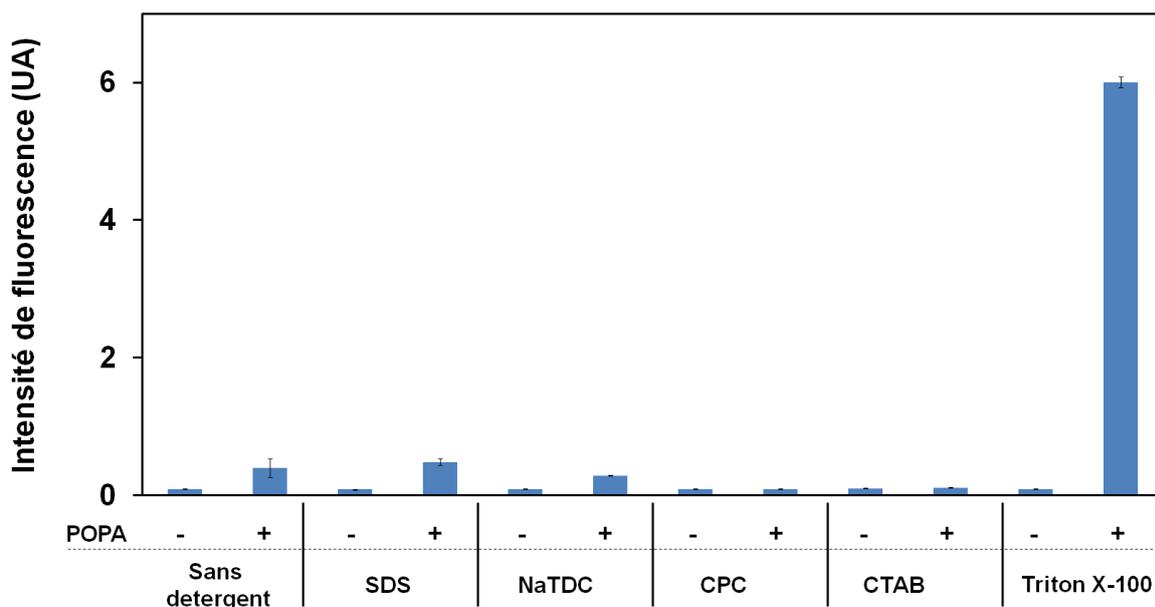


Figure 80 : Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en présence ou en l'absence de 0,26 mM de POPA, à pH 8 et en présence de 1 mM de plusieurs variétés de détergent et de 20 mM de $CaCl_2$. La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires).

Ces résultats suggèrent, ainsi, que l'interaction du PA avec la 8HQ ne dépend pas simplement de la présence d'une charge négative mais qu'elle doit nécessairement faire intervenir un phénomène de chélation du métal par au moins deux charges négatives, telles que celles présentes dans son groupement phosphate, à pH 8 (Cf. 1.2.2.5.). *A contrario*, il apparaît que la présence de détergents positivement chargés, tels que le CPC ou le CTAB, abolit le signal de fluorescence de la 8HQ. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une interaction des charges positives, des groupements pyridinium du CPC et ammonium du CTAB, avec les charges négatives du groupement phosphate du PA, empêchant ainsi toute interaction Ca^{2+} -dépendante avec la 8HQ.

À l'inverse, on peut noter que l'ajout de Triton X-100, un détergent non ionique, induit une très forte augmentation de l'intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm. En effet, l'intensité de fluorescence obtenue est environ 40-fois supérieure au contrôle effectué sans PA et 30-fois supérieure à celle des liposomes de PA. Afin d'expliquer ce phénomène, plusieurs explications sont envisageables. La première serait due à une meilleure solubilisation de la 8HQ, grâce à la chaîne poly(oxyéthylène) du Triton X-100, lui offrant un environnement moins polaire et stabilisant ainsi son état excité par l'absence de molécule d'eau. Cependant, s'il s'agissait de ce phénomène, une diminution concomitante de sa longueur d'onde maximale d'émission aurait lieu et par conséquent, une plus grande énergie serait observable, ce qui n'est pas le cas ici. Une seconde hypothèse, plus plausible, impliquerait une stabilisation de l'état excité de la 8HQ par le cycle aromatique du Triton X-100, augmentant ainsi drastiquement son rendement quantique.

3.2.2.2 Optimisation des conditions de détection du PA

Afin d'optimiser la détection du PA par la 8HQ, les concentrations en détergent et en Ca^{2+} ainsi que les conditions de pH ont été variées. Pour cela, l'influence de la variation des concentrations de Triton X-100 a, tout d'abord, été examinée en présence de POPA, le produit de la réaction d'hydrolyse de la PLD, mais également en présence de POPC, substrat de la PLD (Figure 81A), pour une concentration fixe de Ca^{2+} (20 mM) et à pH 8.

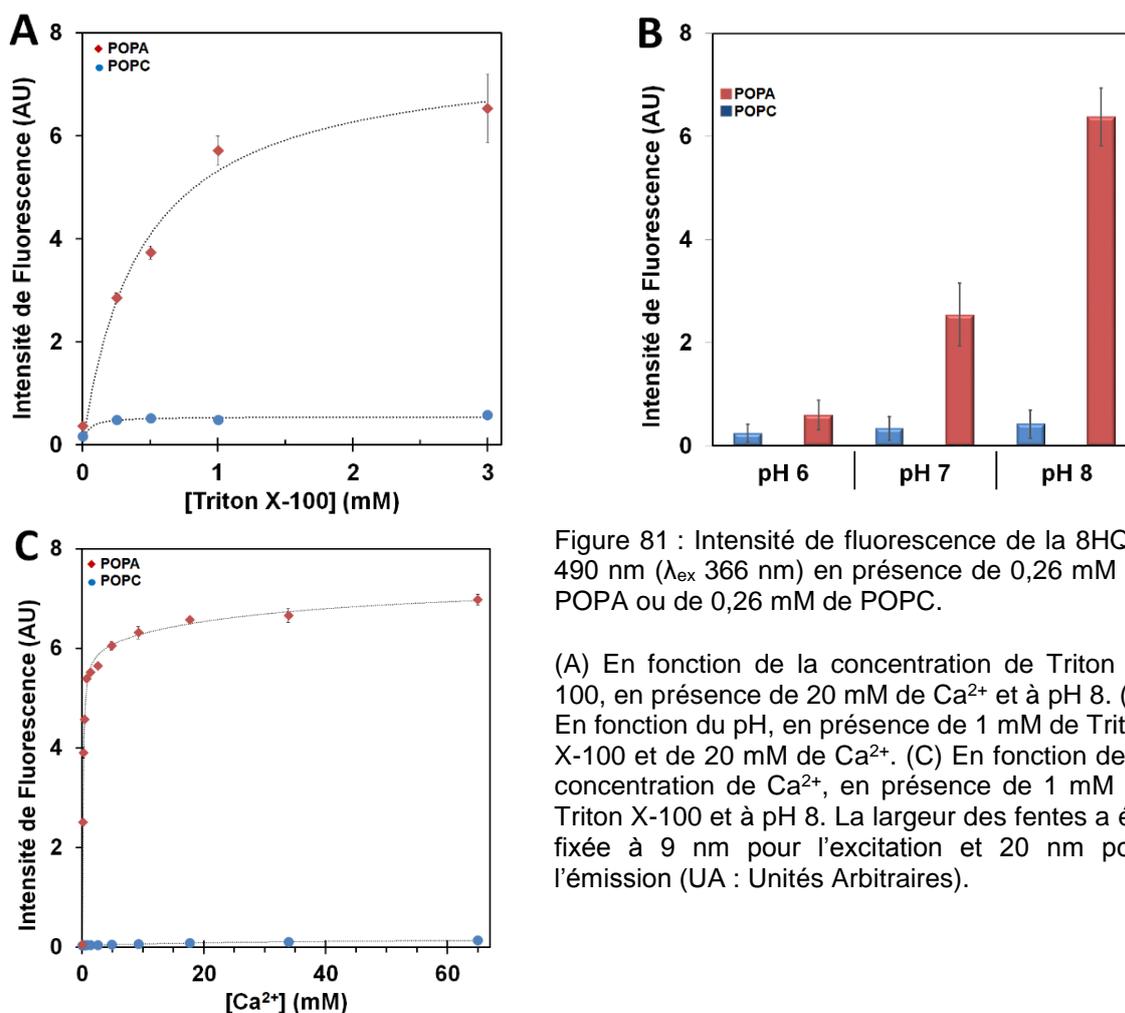


Figure 81 : Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en présence de 0,26 mM de POPA ou de 0,26 mM de POPC.

(A) En fonction de la concentration de Triton X-100, en présence de 20 mM de Ca^{2+} et à pH 8. (B) En fonction du pH, en présence de 1 mM de Triton X-100 et de 20 mM de Ca^{2+} . (C) En fonction de la concentration de Ca^{2+} , en présence de 1 mM de Triton X-100 et à pH 8. La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires).

Ainsi, tandis que l'intensité de fluorescence n'augmente que très légèrement en présence de micelles mixtes de POPC (Figure 81A, ronds bleus), on peut observer une augmentation du signal de la 8HQ à 490 nm pour les micelles mixtes de POPA (Figure 81A, losanges rouges). Cette augmentation est dose dépendante pour des concentrations allant de 0 à 1 mM de Triton X-100 et atteint un plateau pour de plus fortes concentrations de détergent. Ce résultat est en accord avec celui obtenu précédemment (Figure 80), et indique ainsi que le phénomène observé ne provient pas d'un artefact mais qu'il résulte plutôt d'un effet physique sur le complexe PA/ Ca^{2+} /8HQ. En effet, il est fort probable que ce phénomène

soit le fruit d'une solubilisation dose dépendante du complexe PA/Ca²⁺/8HQ, lorsque la concentration de Triton X-100 augmente, jusqu'au plateau où le complexe est alors totalement solubilisé sous forme de micelles mixtes.

De plus, la fluorescence de la 8HQ semble être également dépendante du pH de la solution, comme on peut l'observer sur la figure 81B. En effet, tandis que la fluorescence ne varie que très peu pour la PC (Figure 81B, barres bleues), on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence en présence de POPA (Figure 81B, barres rouges), lorsque le pH de la solution augmente. Cependant, les valeurs d'intensité de fluorescence pour des pH > 8 n'ont pu être obtenues, la solution contenant le PA ayant tendance à précipiter dans ces conditions. Ce résultat suggère, ainsi, que l'état de protonation du PA joue un rôle important dans la formation du complexe PA/Ca²⁺/8HQ et confirme l'hypothèse précédemment émise sur la nécessité de chélater le Ca²⁺, afin d'aboutir au phénomène d'amplification de fluorescence. En effet, comme présenté dans l'introduction (Cf. 1.2.2.5.), le groupement phosphate du PA présente deux pKa (pKa₁ = 3 et pKa₂ = 8), qui induisent un état de protonation différent en fonction du pH. Ainsi, à pH = 8, la moitié des molécules de PA se trouvent dans un état totalement déprotoné et présentent deux charges négatives. Ces deux charges négatives seraient ainsi capables de chélater le Ca²⁺, facilitant alors la chélation du Ca²⁺ par la 8HQ, afin de former un complexe PA/Ca²⁺/8HQ *via* un cycle chélate tétradenté.

Afin d'analyser ce phénomène, l'influence de la concentration de Ca²⁺ sur le signal de la 8HQ a également été étudiée (Figure 81C), en présence d'une concentration fixe de Triton X100 (1 mM) et à pH 8. On observe ainsi, en présence de POPA (Figure 81C, losanges rouges), que l'intensité de fluorescence augmente en fonction de la concentration de Ca²⁺, pour se stabiliser à partir de 0,5 mM, tandis qu'une très légère augmentation du signal est observable en présence de POPC (Figure 81C, ronds bleus). Ce résultat suggère, par conséquent, que la POPC n'intervient pas dans le phénomène de chélation du Ca²⁺. En effet, à l'instar du SDS et du NaTDC, le groupement phosphate de la POPC ne présente qu'une seule charge négative à pH 8 (Cf. 1.2.2.1.), et n'est donc pas capable de chélater le Ca²⁺. Ceci empêcherait, ainsi, la formation d'un complexe PC/Ca²⁺/8HQ, la charge négative du groupement phosphate de la POPC étant, par ailleurs, neutralisée par la charge positive du groupement tri-méthylamine de la choline. Néanmoins, une faible augmentation de l'intensité de fluorescence est tout de même observable dans ces conditions expérimentales. Cependant, ce phénomène résulterait de la formation d'un complexe 8HQ/Ca²⁺/8HQ, plutôt que de la formation d'un complexe PC/Ca²⁺/8HQ, chaque molécule de 8HQ agissant alors comme un héli-chélate.

Pris ensemble, ces résultats indiquent ainsi que la détection du PA par la 8HQ est optimale pour des concentrations de 0,5 mM de Ca^{2+} et de 1 mM de Triton X-100, à pH 8. En effet, associées à la 8HQ et à pH 8, les charges négatives du PA jouent un rôle crucial dans la chélation du Ca^{2+} , permettant ainsi de former un complexe chélateur PA/ Ca^{2+} /8HQ, qui aboutit au phénomène d'amplification de fluorescence par chélation. Par ailleurs, la solubilisation de ce complexe, sous forme de micelles mixtes, ne semble pas être indispensable au phénomène de fluorescence, comme le montre la figure 80. Néanmoins, l'ajout de Triton X-100 induit une augmentation importante de l'intensité de fluorescence de la 8HQ, lors de la formation du complexe PA/ Ca^{2+} /8HQ, ce qui permet d'envisager favorablement le dosage du PA.

3.2.2.3 Optimisation du dosage pour la mesure de l'activité PLD

De manière intéressante, les conditions optimisées pour la détection du PA sont compatibles avec les conditions optimales pour le dosage de l'activité des PLDs végétales. En effet, ces PLDs requièrent notamment la présence de Ca^{2+} pour une activité optimale, *in vitro*. Pour cela, le Ca^{2+} doit être présent à une concentration de 20 mM minimum pour la PLD α (Abdelkafi *et al.*, 2011a), ce qui est compatible avec les conditions de détection du PA précédemment observées (Cf. Figure 81C). Par ailleurs, la présence de détergents anioniques et neutres, en particulier le SDS et le Triton X-100, apparaît critique pour l'obtention d'une activité optimale de la PLD. En effet, comme il l'a été démontré avec la HaPLD α (Abousalham *et al.*, 1997), l'addition séparée de 0,7 mM de Triton X-100 ou de 0,7 mM de SDS induit une augmentation de l'activité d'un facteur 10, tandis que l'association des deux détergents conduit à une augmentation d'un facteur 30.

Il apparaît ainsi que la présence de Triton X-100 est utile, d'une part pour la catalyse, et d'autre part, pour une détection optimale du PA. *A contrario*, la présence de SDS apparaît utile pour la catalyse mais ne semble pas induire d'effet sur la fluorescence du complexe PA/ Ca^{2+} /8HQ, en comparaison des liposomes de PA seul (Cf. Figure 80). Néanmoins, la question de son influence sur la fluorescence du complexe PA/ Ca^{2+} /8HQ, en présence de Triton X-100, apparaît cruciale. En effet, le SDS pourrait notamment contrebalancer les effets du Triton X-100 sur la fluorescence du complexe PA/ Ca^{2+} /8HQ, et ainsi aboutir à une diminution importante de l'intensité de fluorescence.

Afin d'étudier ce phénomène, la fluorescence du complexe PA/ Ca^{2+} /8HQ a été étudiée dans les conditions optimales pour l'activité PLD, en présence de 20 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS et 0,26 mM de POPC ou de POPA. Ainsi, la figure 82A représente les spectres typiques de l'émission de fluorescence de la 8HQ dans les conditions optimisées, en présence de micelles mixtes de POPA ou de micelles mixtes de

POPC, dispersées dans un tampon Tris/HCl 50 mM à pH 8. On peut observer que l'émission de fluorescence du complexe POPA/Ca²⁺/8HQ (Figure 82A, courbe rouge) est maximale à une longueur d'onde de 490 nm pour une excitation à 366 nm, tandis qu'aucune fluorescence n'est détectée en l'absence de Ca²⁺ (Figure 82A, courbe verte). De plus, cette interaction apparaît hautement sélective, puisqu'un tel signal n'est pas observé avec la POPC seule, que ce soit en absence (Figure 82A, courbe violette) ou en présence (Figure 82A, courbe bleue) de Ca²⁺. Ainsi, comme le montre la figure 82B, la 8HQ ne présente qu'une très faible fluorescence en présence de POPC, probablement due à son incapacité à former un complexe POPA/Ca²⁺/8HQ. À l'inverse, en présence de POPA, la 8HQ serait en mesure de former un complexe POPA/Ca²⁺/8HQ, hautement fluorescent dans le domaine du visible (Figure 82C).

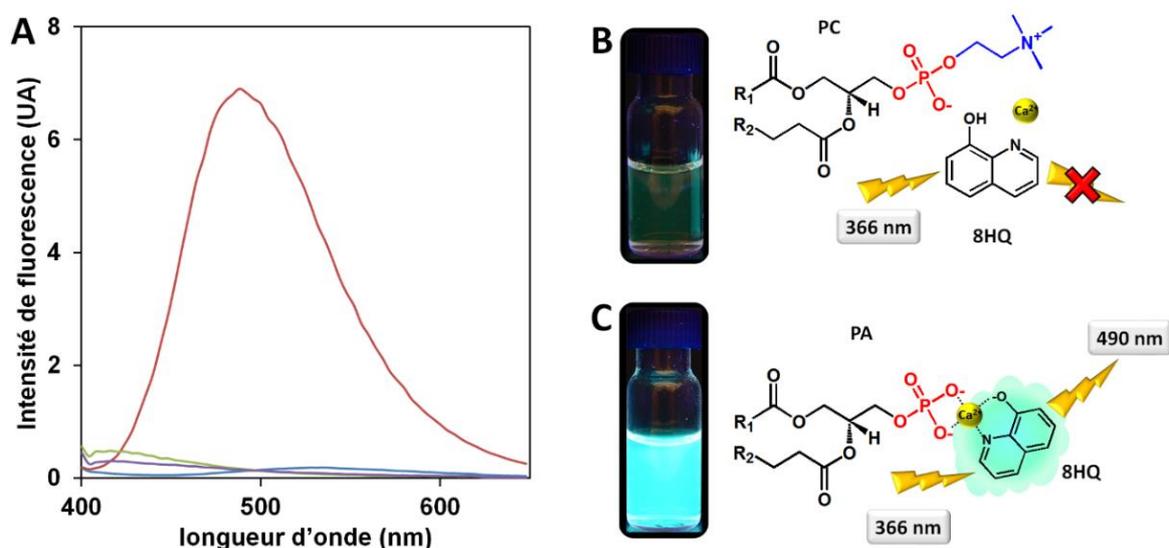


Figure 82 : (A) Spectres d'émission de fluorescence de la 8HQ (λ_{ex} 366 nm) à pH 8 en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS et de 0,26 mM de POPA en présence (courbe rouge) ou en l'absence (courbe verte) de 20 mM de Ca²⁺ ainsi que de 0,26 mM de POPC en présence (courbe bleue) ou en l'absence (courbe violette) de 20 mM de Ca²⁺. La largeur des fentes a été fixée à 10 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires). (B) et (C) Fluorescence des solutions de POPC (B) et de POPA (C) en présence de 20 mM de Ca²⁺, 1 mM de Triton X-100 et 0,7 mM de SDS, éclairées sous UV (λ_{ex} 360 nm).

Dans ces conditions, l'analyse des micelles mixtes par DLS révèle la présence de particules ayant un diamètre hydrodynamique moyen de 8,56 (\pm 2,05) nm pour les micelles contenant de la POPC (Figure 83A) et de 8,05 (\pm 2,07) nm pour celles contenant du POPA (Figure 83B). Ces valeurs sont en accord avec les données de la littérature (Lopez *et al.*, 1998) et suggèrent que les phospholipides sont totalement solubilisés par les détergents, sous forme de micelles mixtes. En outre, les deux mélanges présentent une distribution granulométrique mono-dispersée (Figure 83), ce qui assure, par conséquent, des mesures de fluorescence homogènes, sans diffusion de lumière.

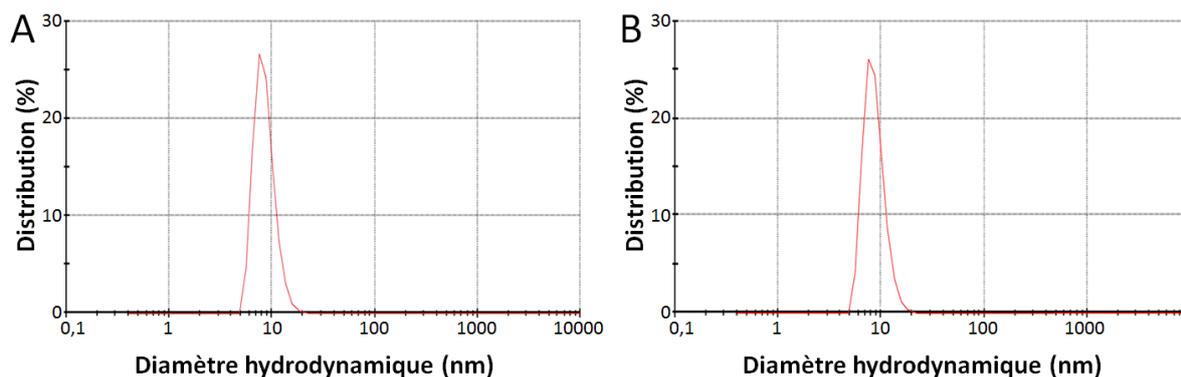


Figure 83 : Analyse des micelles mixtes par DLS. Profile de la distribution des micelles mixtes composées de 0,26 mM de POPC (A) ou de POPA (B) et en présence de 20 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Triton X-100 et 0,7 mM de SDS, à pH 8.

3.2.2.4 Quantification du PA par la 8HQ

Afin de pouvoir mesurer la vitesse d'hydrolyse de la PC par la PLD, il est nécessaire de pouvoir transformer le signal de fluorescence obtenu en quantité de PA. Ceci s'effectue grâce à une gamme étalon du complexe POPA/ Ca^{2+} /8HQ. Pour cela, nous avons examiné l'intensité de fluorescence de la 8HQ en fonction d'une quantité croissante de POPA, avec une diminution concomitante de POPC, afin de maintenir une concentration constante en phospholipides.

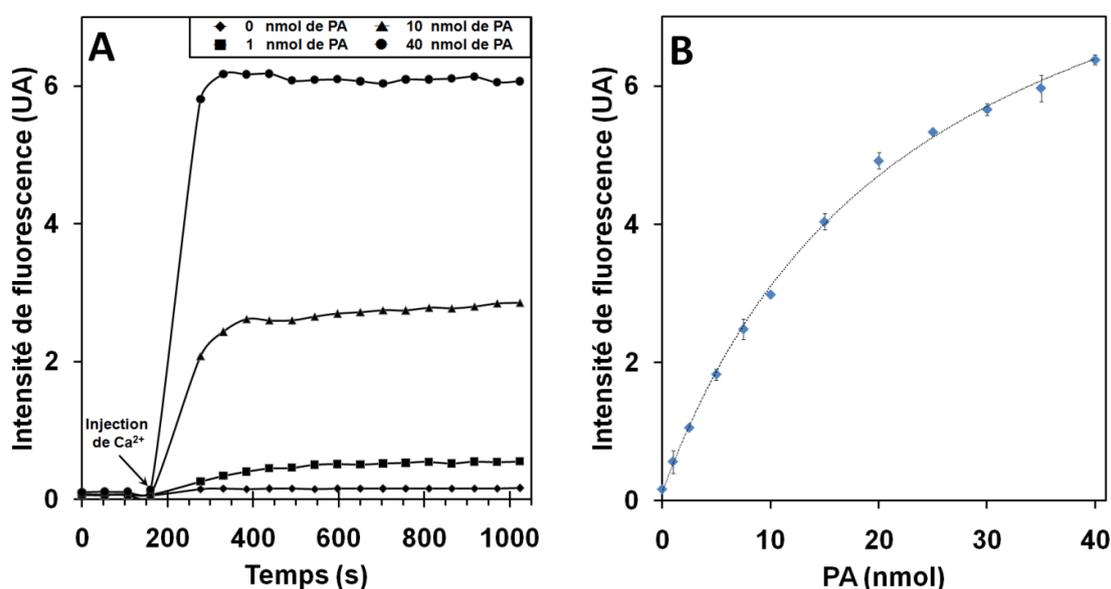


Figure 84 : Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) à pH 8 en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca^{2+} et de proportions variables de POPC/POPA (0,26 mM final) en fonction du temps, suite à l'injection de Ca^{2+} (A) et en fonction de la concentration de POPA (B). La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires).

Ainsi, comme le montre la figure 84A, l'intensité de fluorescence du complexe POPA/Ca²⁺/8HQ augmente de manière dose dépendante avec la quantité de POPA, avec un temps de détection inférieur à 100 s, permettant d'assurer un suivi en temps réel de l'activité PLD. Cette augmentation hyperbolique de la fluorescence permet de générer une gamme étalon (Figure 84B) qui peut être décrite par une équation de type :

$$If = \frac{a [PA]}{b + [PA]} + If_0 \quad (1)$$

Dans cette équation, If et If_0 représentent respectivement les intensités de fluorescence obtenues en présence et en l'absence de PA, tandis que les paramètres a et b sont des constantes et $[PA]$ représente la concentration de PA dans les micelles. Ainsi, dans ces conditions optimisées, le test présente une limite de détection de 1,2 μ M de PA (0,18 nmol), à l'échelle d'une plaque de microtitration. Ceci correspond à 0,45% des phospholipides totaux ajoutés, avec une sensibilité de fluorescence de 0,42 (\pm 0,02) UA / nmol de PA. À titre de comparaison, la méthode de dosage du PA par complexation des ions fer (III) (Cf. 1.8.4.) présente une limite de détection de 10 μ M de PA, à l'échelle d'une plaque de microtitration (Dippe *et al.*, 2009a).

3.2.3. Application du test à la mesure de l'activité PLD

3.2.3.1. Purification de la VuPLD

La VuPLD a été utilisée comme enzyme modèle pour la validation de la méthode de dosage développée dans ce travail de thèse. En effet, à l'inverse de l'AtPLD, nouvellement clonée au laboratoire (Cf. 3.1.2.), la VuPLD est fortement exprimée chez *P. pastoris*, et facilement purifiable en utilisant la résine d'Octyl-Sépharose (Ben Ali *et al.*, 2007). Comme décrit précédemment, la VuPLD s'adsorbe sur la résine en présence de 50 mM de CaCl_2 , tandis que la majorité des autres protéines n'est pas retenue (Figure 85A). Après un lavage de la colonne avec le tampon contenant 30 mM de CaCl_2 , la PLD est ensuite éluée en l'absence de CaCl_2 et en présence d'EDTA. Ainsi, lors de l'éluion, on observe l'apparition d'un pic de protéine entre les fractions 87 à 98.

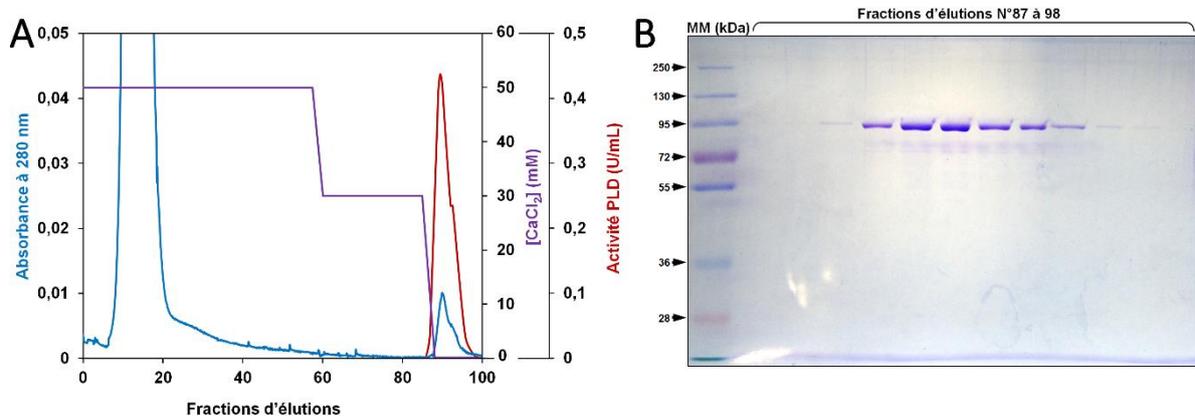
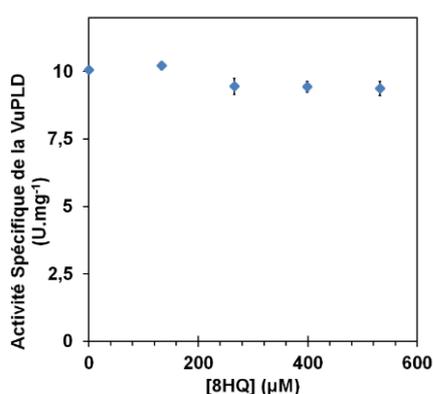


Figure 85 : (A) Chromatogramme de la purification sur colonne d'Octyl-Sépharose de la VuPLD exprimée chez *P. pastoris*. (B) Analyse par SDS-PAGE 10% et révélation au bleu de Coomassie des fractions d'éluion 87 à 98, contenant l'activité PLD. MM : Marqueur de masse moléculaire.

Le suivi de l'activité PLD de chaque fraction d'éluion présente une augmentation similaire au pic d'absorbance mesuré à 280 nm, indiquant ainsi que les fractions d'éluion contiennent la VuPLD (Figure 85A). Afin de confirmer la présence et la pureté de la VuPLD, les fractions d'éluion, qui présentent une activité PLD, sont ensuite analysées par SDS-PAGE. Ainsi, on peut observer sur le gel d'électrophorèse (Figure 85B) la présence d'une bande protéique intense qui migre à une masse moléculaire d'environ 95 kDa. Cette bande majoritaire correspond à la masse moléculaire attendue, indiquant que les fractions d'éluions sont majoritairement composées de VuPLD.

3.2.3.2. Effet de la 8HQ sur l'activité de la VuPLD

Bien que la 8HQ soit largement utilisée comme sonde fluorescente, celle-ci se trouve également être utilisée comme inhibiteur cellulaire de la synthèse d'acide ribonucléique (Fraser *et al.*, 1975). En effet, dans ce contexte, la 8HQ serait capable d'inhiber les ARN polymérase et se comporterait ainsi comme un antibiotique chez les levures et les bactéries. Bien que cet effet soit dû à une chélation par la 8HQ du Mg^{2+} ou du Mn^{2+} , plutôt qu'à une interaction avec les groupements phosphates de l'ADN, il reste néanmoins tout à fait plausible que la 8HQ ait un effet inhibiteur sur l'activité PLD. Dans ce cas, le dosage par la 8HQ du PA généré par la PLD devrait être effectué en point final, avec une première étape de catalyse, suivie d'une seconde étape de dosage.



C'est pourquoi, nous avons examiné l'effet potentiellement inhibiteur de la 8HQ sur l'activité enzymatique de la VuPLD. Pour cela, l'hydrolyse de la POPC a été suivie en présence de concentrations croissantes de 8HQ, allant de 0 à 530 μM (Figure 86). Dans chaque condition, la choline libérée est dosée en point final en utilisant le test chromogénique choline oxydase / peroxydase, comme décrit dans la section expérimentale. Ainsi, comme nous pouvons l'observer sur la figure 86, la 8HQ ne semble pas induire de modifications importantes de l'activité de la VuPLD, par rapport à la condition sans 8HQ, servant de contrôle. En effet, quelle que soit la concentration de 8HQ ajoutée, la VuPLD présente une activité spécifique d'environ 10 $U.mg^{-1}$, ce qui indique l'absence d'effet inhibiteur sur l'activité PLD. Ce résultat suggère, ainsi, que l'utilisation de la 8HQ n'interfère pas avec la réaction d'hydrolyse, catalysée par la PLD. Les conditions de dosage du PA généré par la PLD apparaissent, par conséquent, adaptées au suivi de l'activité PLD.

3.2.3.3. Mesure de l'activité de la VuPLD

Pris ensemble, les résultats obtenus précédemment indiquent que le test développé dans ce travail permet de mesurer directement l'activité PLD par dosage du PA. En effet, ce test repose sur l'utilisation de la 8HQ afin de détecter en temps réel le PA généré par l'action de la PLD. Ainsi, comme décrit précédemment (Figure 82), la 8HQ ne présente qu'une très faible intensité de fluorescence en présence de Ca^{2+} et/ou du phospholipide substrat de la PLD, tel que la PC. *A contrario*, lors de la réaction d'hydrolyse, le PA généré par la PLD devrait être capable de former un complexe avec la 8HQ par l'intermédiaire du Ca^{2+} (Figure 82), aboutissant ainsi au phénomène d'amplification de fluorescence par chélation. Ainsi, le dosage en temps réel de la formation de ce complexe fluorescent à 490 nm devrait permettre, *in fine*, de mesurer l'activité PLD, telle que décrite dans la figure 87.

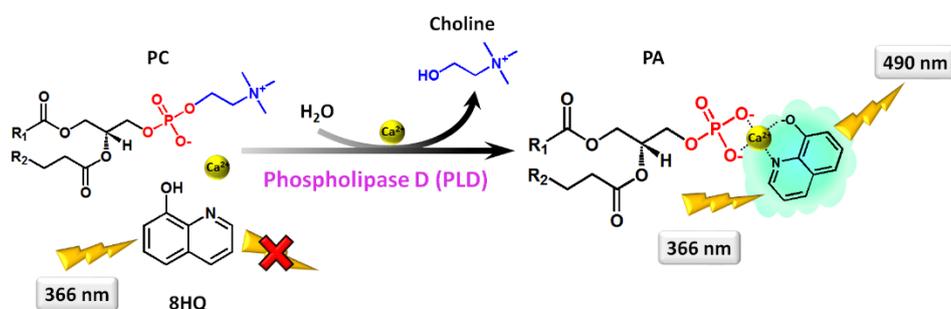


Figure 87 : Principe du test PLD basé sur l'utilisation de la 8HQ. En présence de PC, la 8HQ ne présente qu'une très faible affinité pour le Ca^{2+} . Néanmoins, lors de la formation de PA par la PLD, celui-ci est capable de fixer le Ca^{2+} , induisant ainsi la fixation de la 8HQ sur le complexe PA/ Ca^{2+} . Ce phénomène aboutit à une augmentation de l'intensité de fluorescence de la 8HQ, *via* le phénomène d'amplification de fluorescence par chélation.

Afin de valider cette nouvelle méthode de dosage, la formation de PA généré par la PLD a été suivie au cours du temps, en utilisant la POPC comme substrat. Ainsi, comme on peut l'observer sur la Figure 88A, l'ajout de 1 pmol (~ 100 ng) de VuPLD induit une augmentation de l'intensité de fluorescence à 490 nm de la 8HQ (Figure 88A, courbe rouge), tandis qu'aucun signal n'est enregistré en présence de PLD dénaturée par la chaleur, à 95°C pendant 5 min (Figure 88A, courbe bleue). Ainsi, le signal observé en présence de VuPLD (Figure 88A, courbe rouge) se compose d'un temps de latence, suivi d'une augmentation linéaire de l'intensité de fluorescence. Cette première phase non linéaire correspond à l'état pré-stationnaire de la réaction. Celle-ci peut s'expliquer par le temps que met la PLD à s'adsorber à l'interface des micelles mixtes, résultant en une concentration non constante du complexe enzyme-substrat.

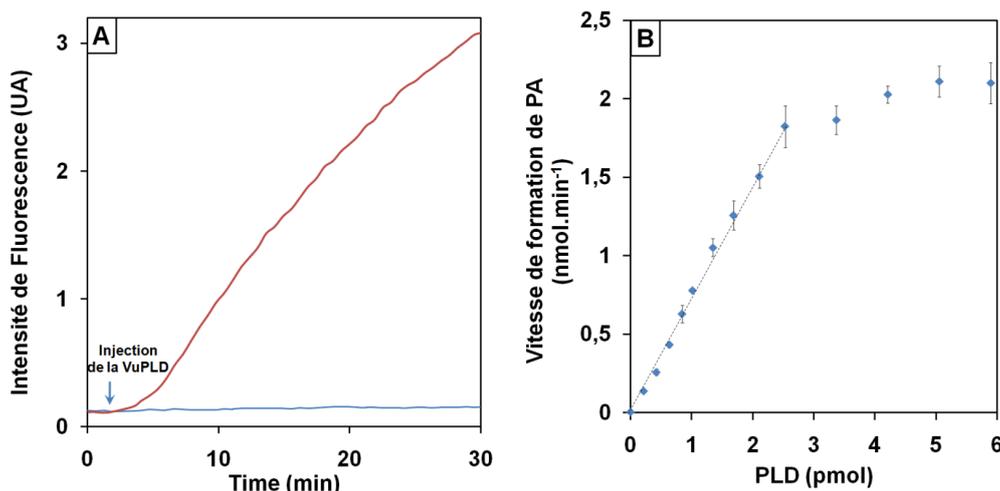


Figure 88 : (A) Suivi de l'intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en fonction du temps, suite à l'injection de 1 pmol de VuPLD (courbe rouge) ou de VuPLD inactivée par la chaleur (courbe bleue), en présence de 0,26 mM de POPC, de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS et de 20 mM de CaCl_2 à pH 8. La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires). (B) Vitesse de formation de POPA suite à l'hydrolyse de la POPC en fonction de la quantité de VuPLD. Les vitesses présentées ont été obtenues en transformant les intensités de fluorescence de la 8HQ à 490 nm en quantité de PA, à l'aide d'une gamme étalon.

Cependant, ce phénomène peut également s'expliquer par un phénomène d'auto-activation de la PLD par son propre produit de réaction. En effet, plusieurs groupes (Geng *et al.*, 1998, Kuppe *et al.*, 2008, Majd *et al.*, 2013) ont précédemment démontré que le PA généré lors de la réaction d'hydrolyse permettait de faciliter l'interaction de la PLD avec les membranes, aboutissant, ainsi, à une augmentation de son activité enzymatique. C'est pourquoi, la vitesse d'hydrolyse est calculée sur la partie linéaire de la cinétique, qui correspond à l'état stationnaire de la réaction. Pour cela, les quantités de PA générées par la PLD sont calculées à partir des intensités de fluorescence en utilisant l'équation (2), déduite de la gamme étalon.

$$[PA] = \frac{b(I_f - I_{f0})}{a - (I_f - I_{f0})} \quad (2)$$

Dans ces conditions, nous pouvons observer que la vitesse de formation du PA, lors de l'hydrolyse de la POPC, est proportionnelle à la quantité de VuPLD (Figure 88B), pour des valeurs comprises entre 0,04 et 2,5 picomoles d'enzymes (4 à 240 ng). Ainsi, une activité spécifique de $9,8 (\pm 0,6) \text{ U.mg}^{-1}$ est obtenue pour la VuPLD, ce qui est en accord avec les valeurs précédemment présentées de 10 U.mg^{-1} , en utilisant le test chromogénique choline oxydase / peroxydase (Cf. 3.2.3.2.), et qui permet de valider le test pour la mesure de l'activité PLD.

3.2.4. Spécificité du test vis-à-vis de l'activité PLD

Afin de pouvoir généraliser l'utilisation de ce test pour la mesure de l'activité PLD, nous avons ensuite validé celui-ci en utilisant des PLD commerciales d'origine végétales ou bactériennes (Figure 89A).

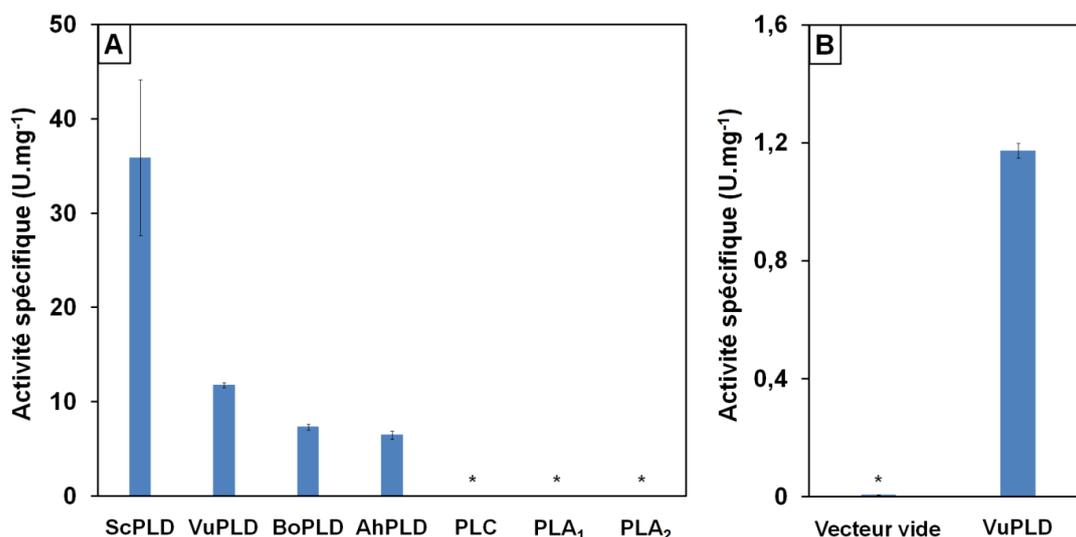


Figure 89 : Mesure des activités PLD de (A) différentes phospholipases ou (B) de lysats cellulaires de *Pichia pastoris* exprimant la VuPLD recombinante ou transformée par son vecteur vide. BoPLD : PLD de *Brassica oleracea*, AhPLD : PLD de *Arachis hypogaea*, ScPLD : PLD de *Streptomyces chromofuscus*, PLA₁ : phospholipase A1 de *Thermomyces lanuginosus*, PLA₂ : phospholipase A2 de pancréas de porc et PLC : phospholipase C de *Clostridium perfringens*. Les activités ont été mesurées en utilisant la 8HQ et sont exprimées en U.mg⁻¹ d'enzyme où 1 unité correspond à 1 μ mol de PA libérée par min. Les étoiles (*) indiquent que les activités sont au-dessous de la limite de détection, correspondant à 3 fois le bruit de fond.

Ainsi, comme on peut l'observer sur la Figure 89A, en plus de la VuPLD, les activités de la BoPLD, de l'AhPLD et de la ScPLD sont également détectées et présentent respectivement des activités spécifiques 35,8 (\pm 8,2), 7,3 (\pm 0,3) et 6,5 (\pm 0,4) U.mg⁻¹, en utilisant la POPC comme substrat. *A contrario*, comme le montre la Figure 89A, aucune formation de PA n'est observée, dans ces conditions, en utilisant la PLA₁ de *Thermomyces lanuginosus*, la PLA₂ de pancréas de porc et la PLC de *Clostridium perfringens*, leurs activités spécifiques étant inférieures à la limite de détection (estimée à trois fois le bruit de fond). Par conséquent, ceci démontre le caractère spécifique de ce test pour la mesure de l'activité PLD, permettant ainsi, une mesure sélective de cette activité en présence d'un mélange composé de plusieurs phospholipases. Par ailleurs, la longueur d'onde d'excitation de la 8HQ ayant été fixée à 366 nm (et non à 270 nm, Cf. 3.2.2.1), la fluorescence intrinsèque des protéines ne risque pas de perturber le signal obtenu. Ceci permet ainsi, de mesurer des activités PLD à partir de lysats cellulaires, comme on peut l'observer pour des extraits protéiques bruts de *P. pastoris* exprimant la VuPLD (Figure 89B), par rapport à leurs contrôles négatifs (cellules transformées par le vecteur vide).

3.2.5. Analyse de la préférence de substrat de la VuPLD

3.2.5.1. Spécificité de détection du PA

Bien que la PC soit le substrat le plus employé pour la mesure de l'activité PLD, ce phospholipide n'est, cependant, pas le seul à pouvoir être hydrolysé. Néanmoins, comme il l'a été mentionné précédemment (Cf. 3.2.1.), de nombreux tests sont restreints à l'utilisation de la PC comme substrat, ce qui empêche la détermination de la spécificité de substrat de la PLD vis-à-vis de la tête polaire des phospholipides. Afin de pallier ce problème, nous avons donc cherché à déterminer si le dosage du PA par la 8HQ permettait de déterminer la spécificité de substrat de la PLD, en le distinguant des phospholipides substrats, tels que la PE, le PG ainsi que la PS.

Afin d'examiner cette préférence de substrat, nous avons, de prime abord, étudié le comportement de la 8HQ en présence de micelles mixtes contenant de la POPE, du POPG et de la POPS en comparaison avec la POPC et le POPA, dans les conditions optimisées précédemment. Ainsi, comme on peut l'observer sur la figure 90, l'intensité de fluorescence de la 8HQ en présence de POPA est environ 40 fois supérieure à celle obtenue en présence de phospholipides zwitterioniques, tels que la POPC ou la POPE. Par ailleurs, on peut remarquer que cette fluorescence est également environ 30-fois plus élevée que celle obtenue en présence de phospholipides chargés négativement, tels que le POPG ou la POPS (Figure 90).

Ce comportement apparaît intéressant puisqu'à l'instar des détergents chargés négativement, ces phospholipides sont eux aussi théoriquement capables d'interagir avec le Ca^{2+} . Néanmoins, de manière similaire à la PC, le POPG ne présente qu'une seule charge négative à pH 8 ($\text{pK}_a = 3,5$; Cf. 1.2.2.2.) et n'est donc pas capable de chélater le Ca^{2+} , pour pouvoir former un complexe $\text{PG}/\text{Ca}^{2+}/8\text{HQ}$. Concernant la POPS, l'absence de signal observé apparaît beaucoup plus difficile à expliquer. En effet, à l'instar du POPA, la POPS présente deux charges négatives, à pH 8, qui sont dues à la présence de son groupement phosphate ($\text{pK}_{a1} \approx 2,6$; Cf. 1.2.2.4.) mais également à la présence de son groupement carboxylate ($3,6 < \text{pK}_{a2} < 5,5$; Cf. 1.2.2.4.), lui permettant de former un complexe de type chélate avec le Ca^{2+} . Néanmoins, la POPS présente également une charge positive à pH 8, due à la présence de son groupement amine ($9,8 < \text{pK}_{a3} < 11,5$; Cf. 1.2.2.4.), capable de neutraliser l'une de ses deux charges négatives. Ainsi, l'absence de signal observé pour la PS pourrait s'expliquer par la présence du groupement amine qui empêcherait la formation optimale d'un complexe $\text{PS}/\text{Ca}^{2+}/8\text{HQ}$.

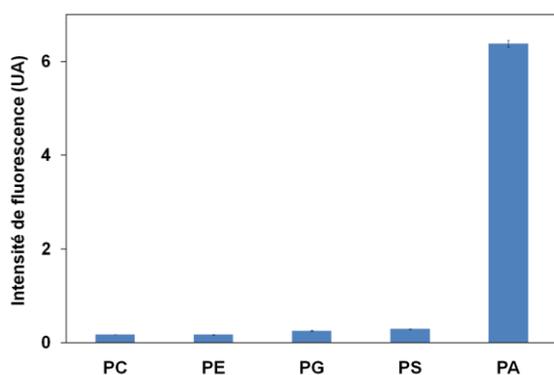


Figure 90 : Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca^{2+} et en présence de 0,26 mM de POPC, POPE, POPG, POPS ou de POPA, à pH 8. La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires).

Par conséquent, le PA semble être le seul de ces phospholipides à pouvoir être détecté dans ces conditions expérimentales. Afin de déterminer si le PA peut être distingué et quantifié parmi ces phospholipides sous l'action de la PLD, nous avons généré une gamme étalon, de manière similaire à celle obtenue pour la PC (Figure 84B). Ainsi, comme le montre la Figure 91, la fluorescence du complexe PA/ Ca^{2+} /8HQ augmente de manière dose dépendante en fonction de la quantité de PA, et ce en présence de POPC, POPE, POPG ou POPS. De plus, on peut noter que les gammes étalon pour les micelles mixtes de POPA (Figure 91A) et de mélange POPA/POPE (Figure 91B), de POPA/POPG (Figure 91C) ou de POPA/POPS (Figure 91D) se superposent à celle du mélange POPA/POPC, obtenue précédemment. L'interaction de la 8HQ avec le PA en présence de Ca^{2+} apparaît ainsi hautement spécifique et permet d'envisager favorablement l'étude de la spécificité de substrat de la PLD.

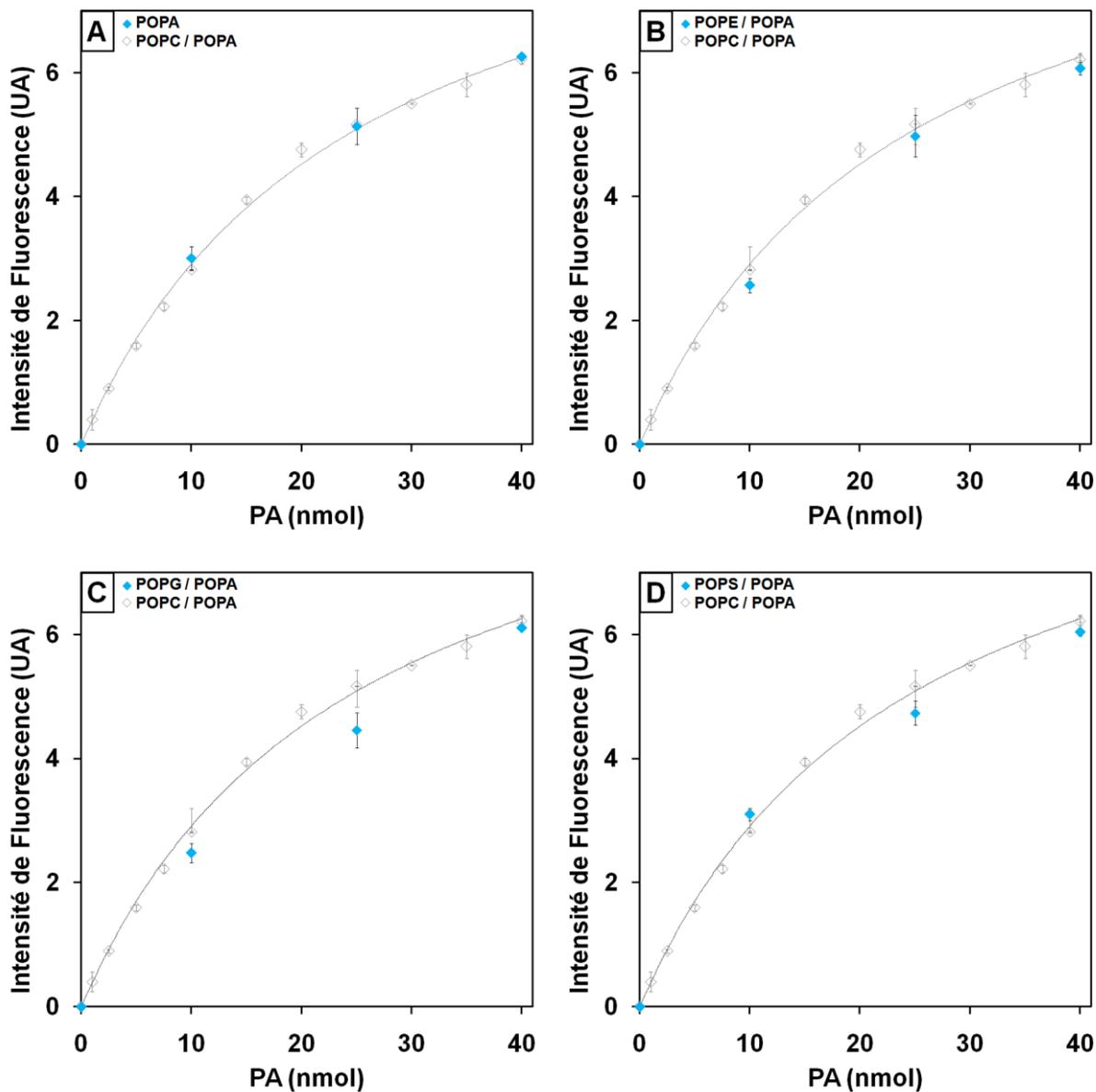


Figure 91 : Intensité de fluorescence de la 8HQ à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en fonction de concentrations croissantes de POPA en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca^{2+} et 0,26 mM de phospholipides, à pH 8. (A) Micelles mixtes de POPA, (B) mélange de POPA/POPE, (C) de POPA/POPG ou (D) de POPA/POPS. Dans chaque cas, la gamme étalon de POPC/POPA obtenue précédemment a été superposée. La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires).

3.2.5.2. Préférence de substrat de la VuPLD

Afin de déterminer la préférence de substrat de la VuPLD vis-à-vis de la tête polaire des phospholipides, la formation de PA a été suivie au cours du temps, en utilisant la POPC, la POPE, le POPG ou la POPS comme substrat. Ainsi, comme on peut l'observer sur la Figure 92A, la VuPLD hydrolyse préférentiellement la PC avec une activité spécifique de 9,8 ($\pm 0,6$) U.mg⁻¹. Par ailleurs, dans ces conditions expérimentales, la VuPLD hydrolyse également la PE et le PG, avec des activités spécifiques de 5,5 ($\pm 0,4$) et de 0,7 ($\pm 0,08$) U.mg⁻¹, respectivement, tandis qu'aucune activité significative n'a pu être observée sur la PS (Figure 92A).

Ces résultats sont, de plus, confirmés par l'analyse des produits de réactions par CCM (Figure 92B), où l'on observe l'apparition d'une bande lipidique migrant à la hauteur du PA témoin (Figure 92B, piste 1), lors de l'hydrolyse de la POPC (Figure 92B, piste 2b), de la POPE (Figure 92B, piste 3b), et du POPG (Figure 92B, piste 4b), tandis qu'aucune bande lipidique n'est observable lors de l'hydrolyse de la POPS (Figure 92B, piste 5b).

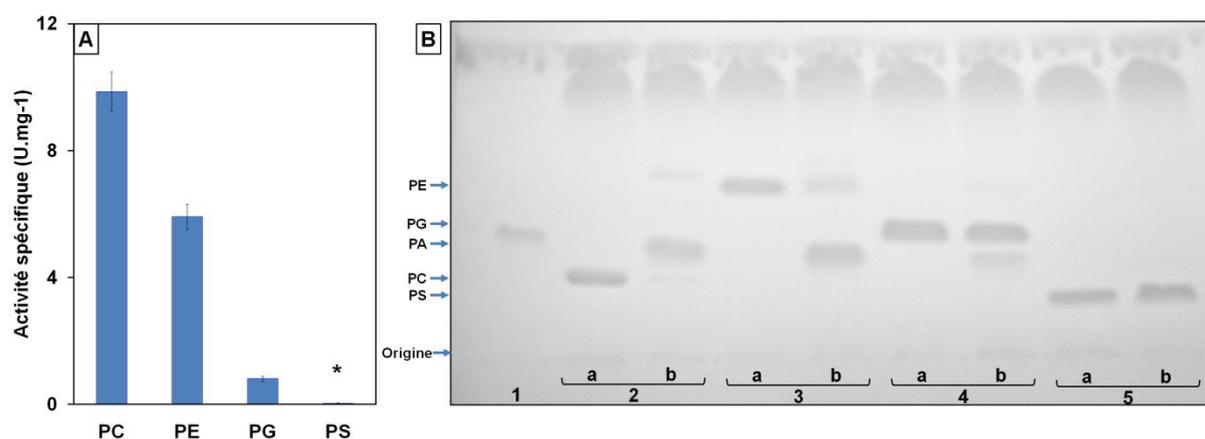


Figure 92 : (A) Mesure de l'activité spécifique de la VuPLD en présence de 1 mM de Triton X-100, de 0,7 mM de SDS, de 20 mM de Ca²⁺ et de 0,26 mM de POPC, POPE, POPG ou de POPS, à pH 8. L'activité enzymatique a été mesurée en utilisant la 8HQ et est exprimée en U.mg⁻¹. L'étoile (*) indique que les activités sont au-dessous de la limite de détection, correspondant à 3 fois le bruit de fond (0,6 nmol de PA / min). (B) Analyse par CCM (révélation au diode) des produits de réaction obtenus en (A) au temps 0 min (a) et 30 min (b). 1 : POPA (contrôle de migration) ; 2 : POPC ; 3 : POPE ; 4 : POPG ; 5 : POPS.

Les résultats obtenus ici sont en accord avec les données précédemment présentées pour la HaPLD, la RcPLD et la GmPLD, qui présentent la même préférence de substrat (Abdelkafi *et al.*, 2011b, Moreno-Perez *et al.*, 2010, Pappan *et al.*, 1998), bien que Dippe et Ulbrich-Hofmann (Dippe *et al.*, 2009a) aient rapporté, en dosant le PA par complexation des ions fer (III), que la PC était rapidement convertie en PA (82.2 U.mg⁻¹) par la BoPLD2, tandis que le PG était hydrolysé beaucoup plus lentement (27.2 U.mg⁻¹) et la PE était très faiblement hydrolysée (3.1 U.mg⁻¹). Par ailleurs, ces auteurs ont également

rapporté l'utilisation d'un système biphasique diéthyléther/eau pour doser les activités des BoPLD1 et BoPLD2, ainsi que des PLD1 (PsPLD1) et PLD2 (PsPLD2) de *Papaver somniferum* (pavot à opium). Dans ces conditions, ces PLDs apparaissent capables d'hydrolyser, par ordre de préférence, la PC > PG = PE > PI > PS pour la BoPLD1, la PE > PG = PC > PI > PS pour la BoPLD2, la PE > PC > PG > PI pour la PsPLD1 ainsi que la PE >> PG > PC > PS > PI pour la PsPLD2 (Dippe *et al.*, 2009b). Ces données suggèrent ainsi que la spécificité d'hydrolyse est une caractéristique propre à chaque PLD, bien que la la PC, la PE et le PG semblent être les substrats préférentiels.

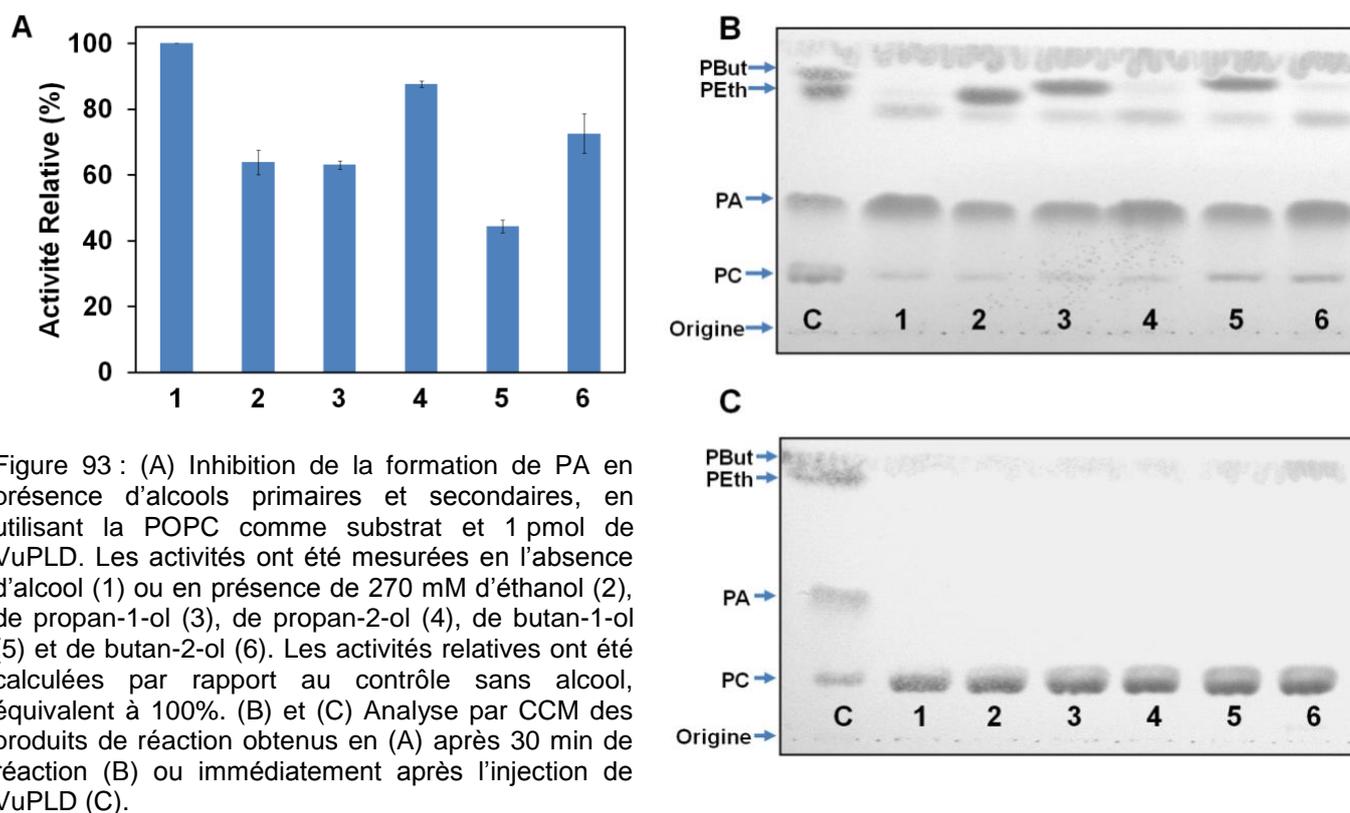
3.2.6. Suivi de la réaction de transphosphatidylation

En parallèle de la réaction d'hydrolyse, la PLD est également capable de catalyser la réaction de transphosphatidylation, en présence d'un alcool primaire substrat. Cette réaction consiste en l'échange de la tête polaire du phospholipide substrat afin de former un phosphatidyl-alcool (Cf. 1.7.3.). Ainsi, la réaction de transphosphatidylation entre en compétition avec la réaction d'hydrolyse et le produit formé dépendra alors de la nature de l'accepteur utilisé (eau ou alcool). Dans ce cas, bien que l'alcool primaire soit un substrat pour la PLD, il peut néanmoins être considéré comme un inhibiteur de la formation de PA. Ainsi, la capacité de la 8HQ à doser le PA peut être mise à contribution, puisqu'en présence d'un alcool primaire, la quantité de PA diminue, au profit de la formation du phosphatidyl-alcool correspondant. La différence des quantités de PA formées, en présence et en l'absence de l'alcool, fournira alors une indication sur la quantité de phosphatidyl-alcool formé.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons examiné « l'inhibition compétitive » de la génération de PA par la VuPLD vers la formation de phosphatidyl-alcool. Pour cela, le suivi de la formation de PA a été quantifié dans les mêmes conditions que décrites précédemment, en présence de 270 mM d'alcools primaires, tels que l'éthanol, le propan-1-ol, et le butan-1-ol mais également en présence de leur alcool secondaire correspondant, le propan-2-ol et le butan-2-ol.

Ainsi, comme on peut l'observer sur la figure 93A, la formation de PA par la PLD est inhibée en présence d'alcools primaires, avec une activité résiduelle de 64%, 63% et 44% pour l'éthanol, le propan-1-ol et le butan-1-ol respectivement, par rapport au contrôle sans alcool. *A contrario*, on peut observer que les alcools secondaires se comportent comme de moins bons accepteurs nucléophiles, induisant une activité résiduelle de 87% et de 72% pour le propan-2-ol et le butan-2-ol, respectivement (Figure 93A). Par ailleurs, ces résultats sont confirmés par l'analyse des produits de réaction par CCM (Figure 93 B et C). En effet, on peut observer l'apparition de bandes lipidiques intenses qui migrent à la hauteur des

phosphatidyl-alcools témoins, pour les réactions effectuées en présence d'alcools primaires (Figure 93B, pistes 2, 3 et 5). À l'inverse, en présence d'alcools secondaires (Figure 93B, pistes 4 et 6), on peut observer l'apparition de bandes lipidiques de faible intensité, qui migrent également à la hauteur des phosphatidyl-alcools témoins. Ces résultats confirment ainsi, qualitativement, que les alcools secondaires sont de moins bons substrats pour la PLD. Ceci est, par ailleurs, en accord avec les données de Ella et collègues (Ella *et al.*, 1997), qui démontraient que les alcools secondaires étaient plus difficilement capables d'accéder au site catalytique de la PLD, afin d'être pris en charge comme substrats.



Afin d'approfondir les résultats obtenus (Figure 93), l'activité de la VuPLD a été examinée en présence de concentrations croissantes d'éthanol. Pour cela, l'inhibition compétitive de la formation de PA vers la formation de phosphatidyléthanol a été suivie au cours du temps (Figure 94A) en utilisant la POPC comme premier substrat. L'éthanol, quant à lui, est utilisé comme second substrat, avec des concentrations allant de 0 à 3 M, afin de former du phosphatidyléthanol et ainsi de réduire la quantité de PA formé.

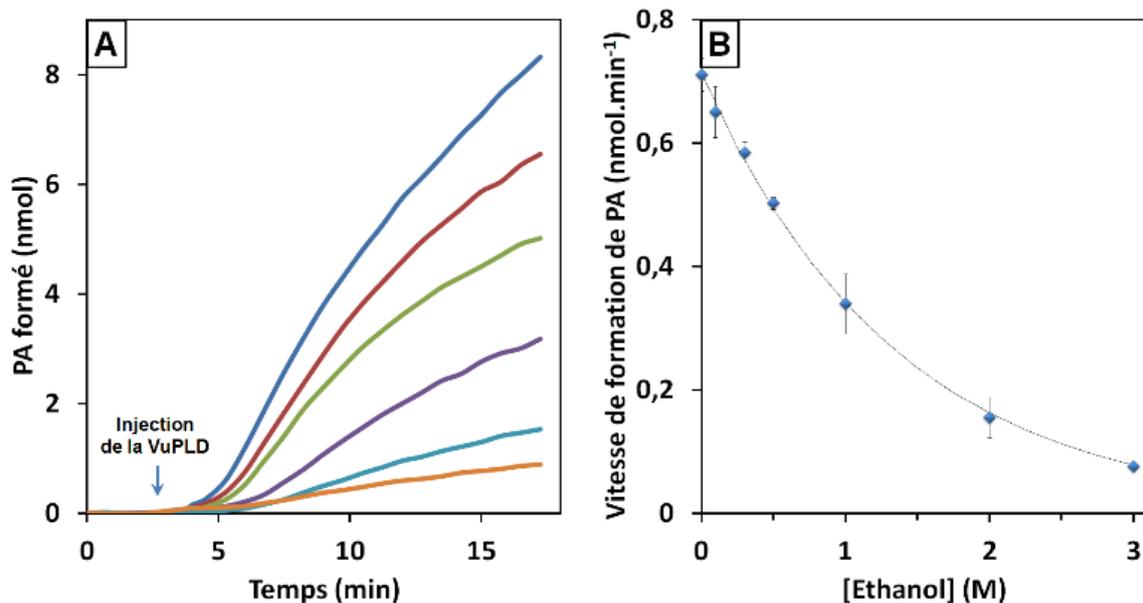


Figure 94 : (A) Cinétique de la formation de PA par la VuPLD en utilisant la POPC comme substrat dans les conditions optimisées précédemment, et en absence (courbe bleue) ou en présence de d'éthanol à des concentrations de 0.1 M (courbe rouge), de 0.5 M (courbe verte), de 1 M (courbe violette), de 2 M (courbe bleu clair) et de 3 M (courbe orange). (B) Vitesse de la formation de PA, obtenue en (A), en fonction de la concentration en éthanol.

Ainsi, comme on peut l'observer sur la figure 94A, la quantité de PA formé au cours du temps diminue lors de l'ajout d'éthanol, par rapport à la condition d'hydrolyse (Figure 94A, courbe bleue). De plus, comme le montre la figure 94B, l'éthanol induit une diminution de la quantité de PA formé, de manière dose dépendante. Dans ces conditions, nous avons déterminé qu'une concentration de $773 (\pm 58)$ mM d'éthanol permet d'inhiber 50% de la formation de PA par la VuPLD (Figure 94B).

3.2.7. Application à l'inhibition de la VuPLD

Comme introduit précédemment (Cf. 1.7.4.3.), il n'existe actuellement que très peu d'inhibiteurs disponibles pour cibler de manière directe l'activité PLD. En effet, les alcools primaires, et notamment le butan-1-ol, ont largement été utilisés en tant qu'inhibiteurs de l'activité PLD, *in cellulo*. Néanmoins, comme montré précédemment (Cf. 1.7.3.), bien qu'ils inhibent effectivement la formation de PA, *via* la réaction de transphosphatidylation, les alcools ne sont pas de réels inhibiteurs mais plutôt des substrats compétiteurs de l'eau. Par ailleurs, d'autres molécules, telles que le resvératrol ou la ciclosporine A ont également été rapportés comme étant capables d'inhiber l'activité PLD, *in vitro*, mais à ce jour, seul l'halopémide et ses dérivés ont été largement caractérisés et ont démontré une réelle efficacité, *in cellulo*, sur les PLD humaines (Cf. 1.7.4.3.).

L'inhibition de la PLD représente néanmoins un enjeu très important du point de vue de la santé humaine, compte tenu de son rôle central dans les phénomènes inflammatoires, neurophysiologiques mais aussi de tumorigenèse et métastatiques (Cf. 1.2.2.5. et 1.3.3.). Ainsi, le faible nombre d'inhibiteurs disponibles à ce jour ne permet pas de cibler l'activité PLD pour le traitement de certaines pathologies, telles que le cancer. Ce phénomène s'explique par la faiblesse des tests développés, jusqu'à présent. En effet, la majorité de ces tests ne sont pas transposables au criblage à haut débit d'inhibiteurs, de par leur caractère discontinu (cas de la radioactivité), leur non-spécificité vis-à-vis de la PLD (détection parallèle de l'activité PLC) ou encore de par leur faible sensibilité. Cependant, grâce au caractère continu du test 8HQ, développé durant ce travail, associé à la sensibilité de la fluorescence et ce, à l'échelle d'une plaque de microtitration, il apparaît possible de tester, en parallèle, l'effet inhibiteur sur l'activité PLD de plusieurs centaines de molécules, telles que celles disponibles dans les chimiothèques.

Afin de réaliser cela, la détection du PA généré par la PLD, en utilisant le test 8HQ, a tout d'abord été contrôlée dans les conditions généralement utilisées pour le criblage d'inhibiteurs. En effet, lors de criblages à hauts débits, les inhibiteurs fournis par les chimiothèques sont généralement solubilisés par du diméthylsulfoxyde (DMSO), un solvant polaire miscible à l'eau ainsi qu'aux solvants organiques. Par ailleurs, l'ajout d'inhibiteurs nécessite généralement un temps d'incubation, afin de mieux potentialiser leurs effets sur l'enzyme cible.

Ainsi, comme le montre la figure 95, l'activité de la VuPLD ne présente pas de variations notables, lors d'ajout de quantités croissantes de DMSO (pour des concentrations de DMSO < 5%), indiquant que le test utilisant la 8HQ peut être utilisé pour cribler des molécules hydrophobes. De même, l'activité de la VuPLD ne semble pas être affectée lors

d'une incubation de 30 min à température ambiante (Figure 95). Ces résultats suggèrent ainsi, que les tests d'inhibitions de la PLD peuvent être effectués dans les conditions généralement utilisées pour le criblage de chimiothèques.

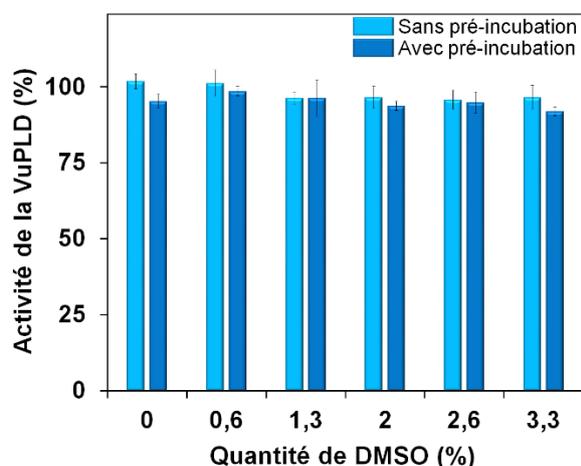


Figure 95 : Contrôle de l'activité de la VuPLD en présence de quantités croissantes de DMSO, sans (bleu clair) ou après (bleu foncé) une pré-incubation de 30 min, à température ambiante. Les activités sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle sans DMSO et sans pré-incubation.

Afin d'approfondir ce travail, l'inhibition de la VuPLD, par des molécules précédemment décrites comme bioactives dans la littérature, a été investiguée (Figure 96 B et C). Pour cela, la VuPLD a été incubée, d'une part en l'absence ou en présence d'éthanol, servant de contrôle d'inhibition (Figure 96A), mais également en présence de ciclosporine A (Figure 96B, bleu clair) ou de resvératrol (Figure 96B, bleu foncé). Par ailleurs, comme le montre la figure 96C, la VuPLD a également été incubée en présence d'halopémidé ainsi que de *VU0359595* (Dérivé 1) et de *VU0285655* (Dérivé 2), qui inhibent respectivement les PLD -1 et -2 humaines, de manière sélective (Cf. 1.7.4.3.).

Ainsi, tandis qu'en présence d'éthanol, l'activité de la VuPLD diminue de manière importante, par rapport au contrôle négatif d'inhibition, la ciclosporine A et le resvératrol ne semblent pas présenter d'effets inhibiteurs marqués. De manière intéressante, ces résultats apparaissent être en contradiction avec les données fournies par Majd et collègues (Majd *et al.*, 2009), qui rapportaient une inhibition d'au moins 90% de l'activité de la BoPLD, en présence de 5 μ M de ciclosporine A ou de 130 μ M de resvératrol (Cf. 1.7.4.3.). Ainsi, ces résultats, par ailleurs, reproduits par d'autres manipulateurs du laboratoire, peuvent suggérer que l'effet inhibiteur de ces molécules serait dépendant de la PLD ciblée.

Néanmoins, cette hypothèse n'apparaît que peu convaincante, puisque la VuPLD et la BoPLD sont, d'une part, toutes deux des PLDs de plantes et, d'autre part, présentent un taux d'identité de séquence peptidique de 81%. Par ailleurs, il est important de noter qu'il s'agit de la seule étude ayant rapporté un effet inhibiteur de ces molécules sur l'activité des PLDs de plantes. En effet, l'inhibition de l'activité PLD par ces molécules a originellement été décrite pour les PLDs de mammifères (Cf. 1.7.4.3.), qui présentent des domaines et des modes de régulations différents des PLDs végétales. Enfin, il est également important de

noter que les auteurs n'ont testé qu'une seule concentration de chaque molécule et n'ont pas fourni de constante d'inhibition ou d'IC₅₀, suggérant que les effets inhibiteurs observés lors de cette étude pouvaient être des d'artefacts.

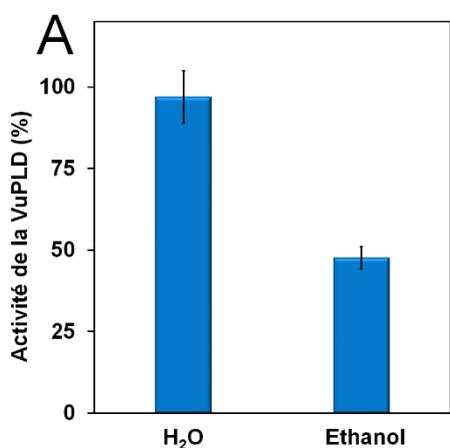
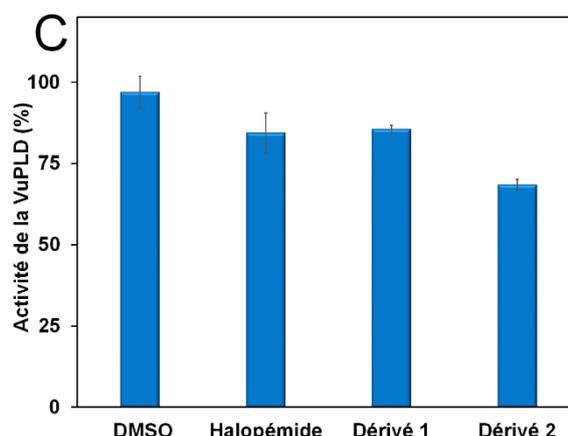
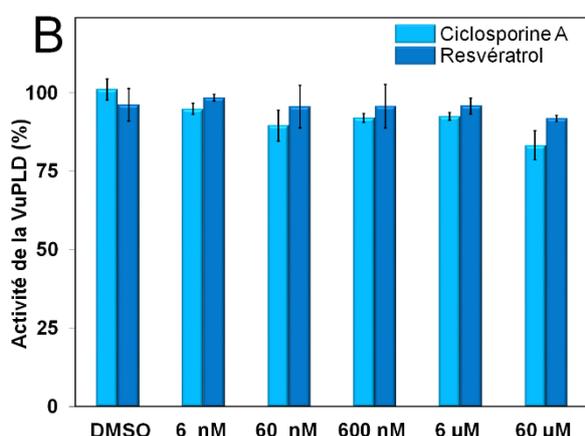


Figure 96 : Tests d'inhibition de la VuPLD (0.6 nM). (A) Contrôle de l'inhibition de la formation de PA par la VuPLD, en l'absence (-) ou en présence de 750 mM d'éthanol (+). (B) Test d'inhibition de la VuPLD en présence de quantités croissantes de ciclosporine A (bleu clair) ou de resvératrol (bleu foncé). (C) Test d'inhibition de la VuPLD en présence de 40 µM d'halopémide ou de ses dérivés (Cf. texte). Pour (B) et (C), les activités sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle incubé en présence de DMSO seul.



A contrario, en comparaison de l'activité de la VuPLD en présence de DMSO, servant de contrôle négatif d'inhibition, l'halopémide et ses dérivés (Figure 96C) présentent, quant à eux, un effet inhibiteur pour une concentration de 40 µM. De plus, cet effet est beaucoup plus prononcé pour le dérivé 2, qui induit jusqu'à 35 % d'inhibition de l'activité de la VuPLD (Figure 96C). Par ailleurs, ces résultats ont été confirmés un autre membre du laboratoire (Dr. Houda ABLA, recrutée dans le cadre du criblage d'inhibiteurs de la PLD de la chimiothèque de l'ICBMS), qui a démontré qu'une concentration de 100 µM induisait une inhibition de l'activité de la VuPLD, allant de 40 à 60% pour l'halopémide et ses dérivés, par rapport au contrôle négatif (DMSO seul).

Ainsi, ces résultats apparaissent intéressants, puisqu'à ce jour, seules les PLDs humaines ont été rapportées comme étant inhibées par ces molécules. Néanmoins, l'halopémide et ses dérivés inhiberaient les PLDs humaines de manière non compétitive, en se fixant sur un site, différent du site catalytique (Selvy *et al.*, 2011). Il semble donc possible,

au vu de ces résultats, que les PLDs végétales, et *a fortiori* la VuPLD, présentent un site de fixation à l'halopémide, similaire aux PLDs humaines.

Enfin, l'activité de la VuPLD a également été testée en présence de molécules mimant les phospholipides, mais non hydrolysables par la PLD, telles que le vanadate de sodium (Na_3VO_4) (Cf. 1.7.4.3.). Pour cela, la VuPLD a été incubée en présence de quantités croissantes de Na_3VO_4 , qui est capable de mimer le groupement phosphate des phospholipides (Li *et al.*, 1999). Ainsi, comme on peut l'observer sur la Figure 97A, la quantité de PA formé au cours du temps diminue lors de l'ajout de vanadate, par rapport à la condition contrôle (Figure 97A, courbe rouge). De plus, comme le montre la Figure 97B, le vanadate induit une diminution de la quantité de PA formé, de manière dose dépendante. Ainsi, dans ces conditions, nous avons déterminé qu'une concentration de $37,5 (\pm 1,5) \mu\text{M}$ de vanadate permet d'inhiber 50% de la formation de PA par la VuPLD. Ces résultats sont en accord avec les données précédemment rapportées par Li et collègues (Li *et al.*, 1999) ainsi que Khatoon et collègues (Khatoon *et al.*, 2015), qui ont respectivement déterminé une IC_{50} , pour le Na_3VO_4 , de $35 \mu\text{M}$ pour la BoPLD et de $33 \mu\text{M}$ pour la PLD de *Brassica juncea*.

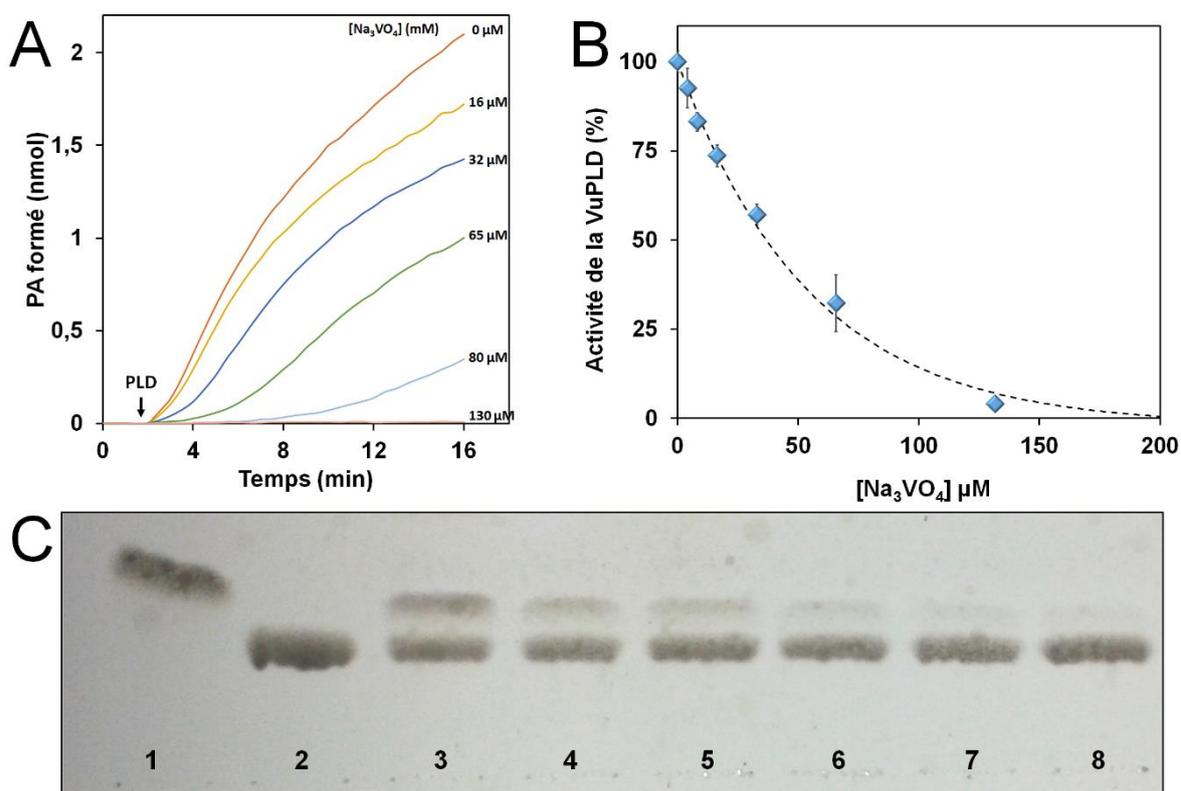


Figure 97 : (A) Cinétique de la formation de PA par la VuPLD en utilisant la POPC comme substrat et en présence de concentrations croissantes de vanadate de sodium. (B) Vitesse de la formation de PA en fonction de la concentration en vanadate de sodium. (C) Analyse par CCM et révélation au diiode des produits de réaction obtenus. Piste 1 : contrôle de migration PA ; piste 2 : contrôle de migration PC. Pistes 3 à 8, produits d'hydrolyse de la PC par la VuPLD en l'absence (piste 3) ou en présence de concentrations croissantes de Na_3VO_4 (pistes 4 à 8). Piste 3 : $0 \mu\text{M}$; Piste 4 : $16 \mu\text{M}$; Piste 5 : $32 \mu\text{M}$; Piste 6 : $65 \mu\text{M}$; Piste 7 : $80 \mu\text{M}$; Piste 8 : $130 \mu\text{M}$.

3.2.8. Modifications chimiques de la 8HQ

Afin de parfaire la caractérisation de la 8HQ en tant que sonde fluorescente pour la détection du PA, nous avons examiné l'impact de substitutions chimiques sur son intensité de fluorescence. En effet, comme rapporté précédemment par Pearce et collègues (Pearce *et al.*, 2001), l'addition de groupements sulfonates ou sulfonamides sur les carbones en position 5 et / ou 7 de la 8HQ induit une augmentation du rendement quantique de la 8HQ, tandis que l'addition de groupement nitro sur les mêmes positions aboutit à une fluorescence très faible ou non mesurable (Pearce *et al.*, 2001).

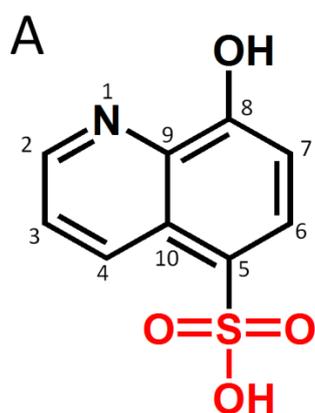
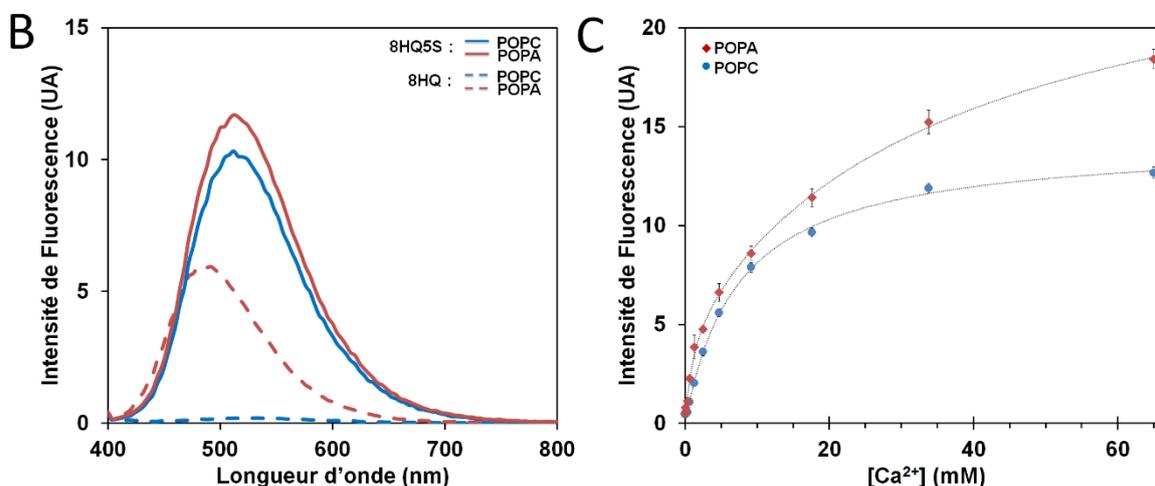


Figure 98 : (A) Structure de la 8HQ5S. (B) Spectres d'émission de fluorescence de la 8HQ (traits discontinus) et de la 8HQ5S (traits pleins) en présence de 20 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS et 0,26 mM de POPA (en rouge) ou 0,26 mM de POPC (en bleu), à pH 8 (λ_{ex} 366 nm). La largeur des fentes a été fixée à 10 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission. (C) Intensité de fluorescence de la 8HQ5S à 490 nm (λ_{ex} 366 nm) en fonction de la concentration de Ca^{2+} et en présence de 1 mM de Triton X-100 et de 0,26 mM de POPA ou de 0,26 mM de POPC, à pH 8. La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires). Les concentrations de la 8HQ5S et de la 8HQ sont de 60 μM .



Nous avons, tout d'abord, étudié l'effet de l'ajout d'un groupement sulfonate sur le carbone en position 5 de la 8HQ (Figure 98A), dans les conditions expérimentales décrites précédemment. En effet, l'acide 8-hydroxyquinoléine-5-sulfonique (8HQ5S) est un dérivé de la 8HQ, disponible commercialement, dont le groupement acide sulfonique se comporte comme un attracteur d'électrons et conduit ainsi à une augmentation importante du rendement quantique de la 8HQ.

Ainsi, bien que la 8HQ5S présente effectivement une amélioration importante de l'intensité de fluorescence par rapport à la 8HQ (Figure 98B), cette sonde ne semble pas être adaptée au dosage du PA. En effet, comme le montre la Figure 98C, le signal de fluorescence est augmenté non seulement en présence de POPA (losanges rouges) mais également en présence de POPC (ronds bleus). Ce phénomène est probablement dû à une plus grande solubilité de la 8HQ5S qui, à cause de son groupement sulfonate, ne parvient pas à s'enfouir correctement dans les micelles.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons synthétisé des dérivés de la 8HQ, par voie chimique, en collaboration avec l'équipe « Chimie Organique 2-Glycochimie » de l'ICMBS (Dr. Michele FIORE). Ces dérivés présentent des groupements sulfonamides sur les carbones en position 5 et/ou 7 de la 8HQ, sur lesquels sont greffées des chaînes dodécyles, tel que décrit dans la figure 99. La présence des groupements sulfonate a été conservée afin d'augmenter les rendements quantiques, de manière similaire à la 8HQ5S et comme décrit par Pearce et collègues (Pearce *et al.*, 2001), tandis que la chaîne dodécyle, hydrophobe, permet un ancrage dans les membranes.

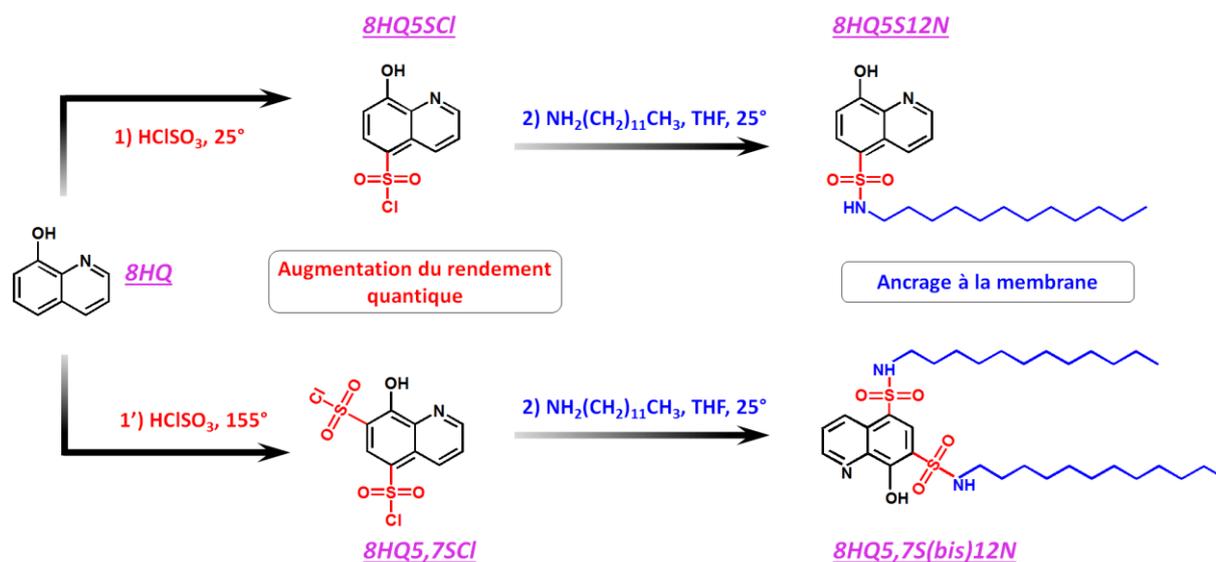


Figure 99 : Schéma réactionnel de la synthèse des dérivés dodécylsulfonamides de la 8HQ (THF : tétrahydrofurane).

Ainsi, la première étape de ces réactions de synthèse consiste à ajouter un groupement chlorosulfonique sur le carbone en position 5 (Figure 99, voie 1), ou en position 5 et 7 de la 8HQ (Figure 99, voie 1'). Ce groupement contient un substituant halogéné, le chlore, qui permettra d'effectuer une substitution nucléophile par une molécule de dodécylamine ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$). En effet, dans ces conditions, le groupement amine primaire (nucléophile) est capable d'effectuer une attaque nucléophile sur l'atome de soufre (électrophile) aboutissant ainsi à une substitution du chlore (nucléofuge). Cette seconde

réaction permet, finalement, de former une molécule de 8-hydroxyquinoline-5-sulfododécylamine (8HQ5S12N) ou une molécule de 8-hydroxyquinoline-5,7-bis-sulfododécylamine (8HQ5,7S(bis)12N) (Figure 99).

Afin d'étudier la capacité de ces deux sondes à détecter le PA en présence de Ca^{2+} , nous avons comparé leur fluorescence avec celle de la 8HQ, dans les conditions optimisées précédemment. Ainsi, la figure 100A représente les spectres typiques de l'émission de fluorescence de la 8HQ5,7S(bis)12N, en présence de micelles mixtes de POPA et de micelles mixtes de POPC, dispersées dans un tampon Tris 50 mM à pH 8. On peut observer que la 8HQ5,7S(bis)12N présente effectivement une amélioration importante de l'intensité de fluorescence par rapport à la 8HQ mais qu'elle se comporte néanmoins d'une manière similaire à la 8HQ5S (Cf. Figure 98B).

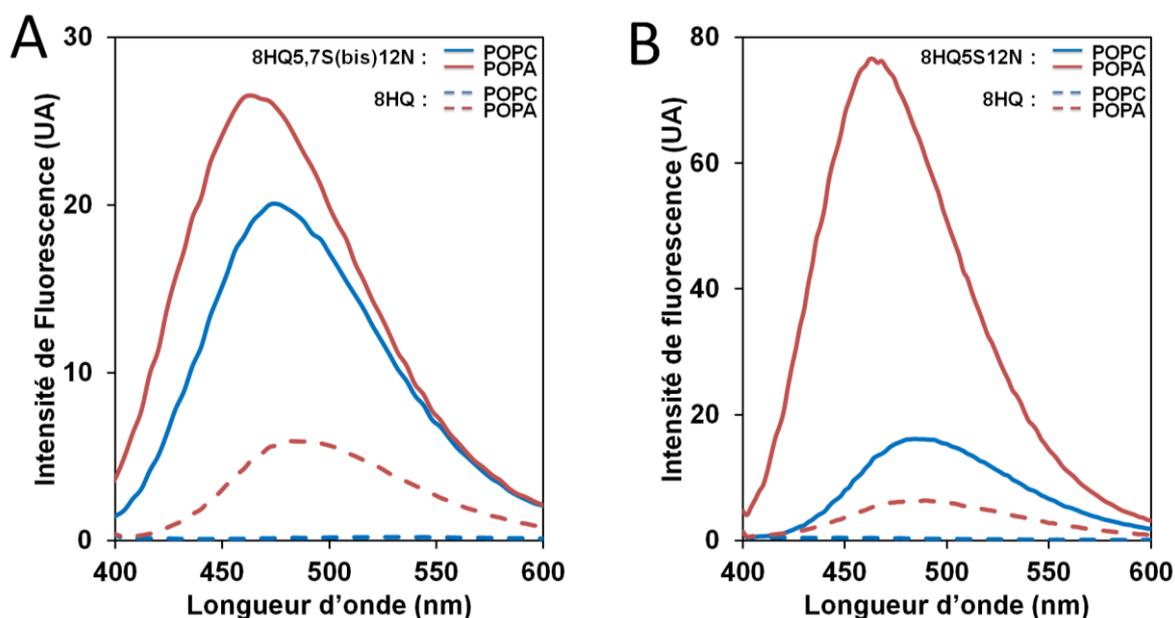


Figure 100 : Spectres d'émission de fluorescence de (A) la 8HQ5,7S(bis)12N (traits pleins) et de (B) la 8HQ5S12N (traits pleins) en comparaison avec la 8HQ (traits tirets) et en présence de 20 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS et 0,26 mM de POPA (en rouge) ou 0,26 mM de POPC (en bleu), à pH 8 (λ_{ex} 366 nm). La largeur des fentes a été fixée à 10 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission, la concentration de la 8HQ5S12N a été fixée à 6 μM et celles de la 8HQ5,7S(bis)12N et de la 8HQ à 60 μM .

En effet, à l'instar de la 8HQ5S, la 8HQ5,7S(bis)12N présente non seulement une augmentation de son intensité de fluorescence, en présence de POPA, environ 6 fois plus importante que celle de la 8HQ, mais présente également une augmentation, en présence de POPC, environ 70 fois plus importante que celle de la 8HQ (Figure 100A). Ainsi, le signal de fluorescence obtenu pour le POPA, en présence de 8HQ5,7S(bis)12N, est environ 1,3 fois plus important que celui obtenu pour la POPC. Par conséquent, les signaux de fluorescence ne permettent pas d'obtenir une différence suffisamment importante entre le

POPA et la POPC et suggèrent que la 8HQ5,7S(bis)12N n'est pas adaptée au suivi de l'activité PLD.

Concernant la caractérisation de la 8HQ5S12N (Figure 100B), l'intensité de fluorescence du complexe POPA/Ca²⁺/8HQ5S12N apparaît maximale à une longueur d'onde de 460 nm, tandis qu'en présence de POPC, la 8HQ5S12N présente un maximum de fluorescence à 490 nm. Ainsi, il semble que la fixation du PA par la 8HQ5S12N induise un décalage de la fluorescence vers le bleu, qui est par ailleurs, accompagné d'une augmentation concomitante de son intensité de fluorescence. En effet, on peut observer sur la figure 100B, que la 8HQ5S12N présente une augmentation de son intensité fluorescence environ 5 fois plus importante en présence de POPA qu'en présence de POPC (Figure 100B). Ainsi, la différence entre les signaux obtenus pour le POPA et la POPC apparaît suffisante pour utiliser cette sonde pour le suivi de l'activité PLD. De plus, ce résultat permet également de valider l'hypothèse de départ, quant au caractère polaire du groupement sulfonate et à la nécessité d'ancrer la sonde dans les micelles.

Par conséquent, ces résultats indiquent que l'addition d'un seul groupement dodécylsulfonamide à la 8HQ permet de conserver la propriété d'amplification de fluorescence observée pour la 8HQ mais également de conserver l'amélioration du rendement quantique obtenu pour la 8HQ5S. En effet, comme on peut l'observer sur la figure 100B, la 8HQ5S12N apparaît beaucoup plus sensible que la 8HQ pour la détection du PA, avec une intensité de fluorescence environ 15 fois plus importante pour le complexe POPA/Ca²⁺/8HQ5S12N, par rapport au complexe POPA/Ca²⁺/8HQ. De plus, comme indiqué dans la Figure 100B, les expériences ont dû être réalisées à une concentration de 6 µM de 8HQ5S12N contre 60 µM de 8HQ, afin de ne pas dépasser la limite de détection du fluorimètre.

Afin de valider l'utilisation de la 8HQ5S12N pour le suivi des activités PLD, la formation de PA généré par la VuPLD a été suivie au cours du temps, en utilisant la POPC comme substrat. Ainsi, comme on peut l'observer sur la Figure 101, l'ajout de 1 pmol (~ 100 ng) de VuPLD induit une augmentation rapide de l'intensité de fluorescence à 460 nm pour la 8HQ5S12N, tandis qu'un signal beaucoup plus faible est enregistré pour la 8HQ. Ces résultats indiquent ainsi que la 8HQ5S12N est très sensible pour le suivi de la formation de PA par la PLD et qu'elle serait beaucoup plus adaptée à la mesure de faibles activités PLD, telles que celle des PLDs de mammifères.

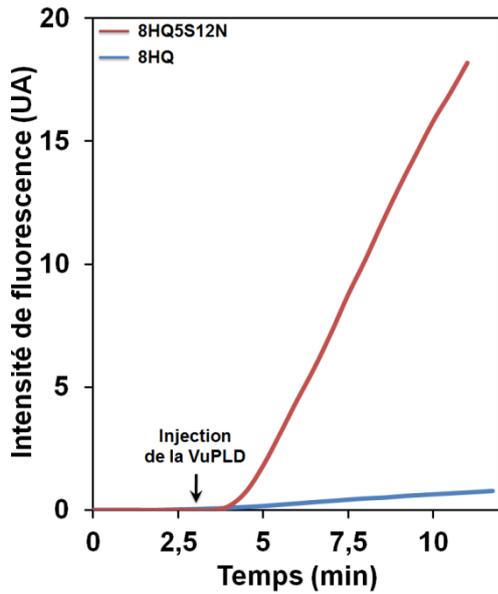


Figure 101 : Suivi de l'intensité de fluorescence à 460 nm (λ_{ex} 366 nm) de la 8HQ (en bleu) et de la 8HQ5S12N (en rouge) en fonction du temps, suite à l'injection de 1 pmol de VuPLD, en présence de 0,26 mM de POPC, 1 mM de Triton X-100, 0,7 mM de SDS et 20 mM de Ca^{2+} , à pH 8. La largeur des fentes a été fixée à 9 nm pour l'excitation et 20 nm pour l'émission (UA : Unités Arbitraires). La concentration de la 8HQ5S12N a été fixée à 6 μM et celle de la 8HQ à 60 μM .

Par ailleurs, la propriété d'ancrage dans les membranes de la 8HQ5S12N, associée à son importante intensité de fluorescence, suggère que cette sonde peut être utilisée comme fluorophore membranaire pour la visualisation du PA par microscopie. Ainsi, la 8HQ5S12N a été incorporée dans des vésicules géantes (GV) afin de pouvoir observer sa fluorescence par microscopie confocale, en présence de Ca^{2+} et en présence ou en l'absence de POPA (Figure 102). Pour cela, la fluorescence de GV, composées de POPC (Figure 102A) ou d'un mélange de POPC / POPA pour un rapport 80 / 20 (Figure 102B), a été visualisée en utilisant les filtres DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et GFP (protéine fluorescente verte). En effet, ces filtres permettent d'observer une gamme spectrale d'émission comprise entre 435-485 nm (filtre DAPI) ou entre 500-550 nm (filtre GFP).

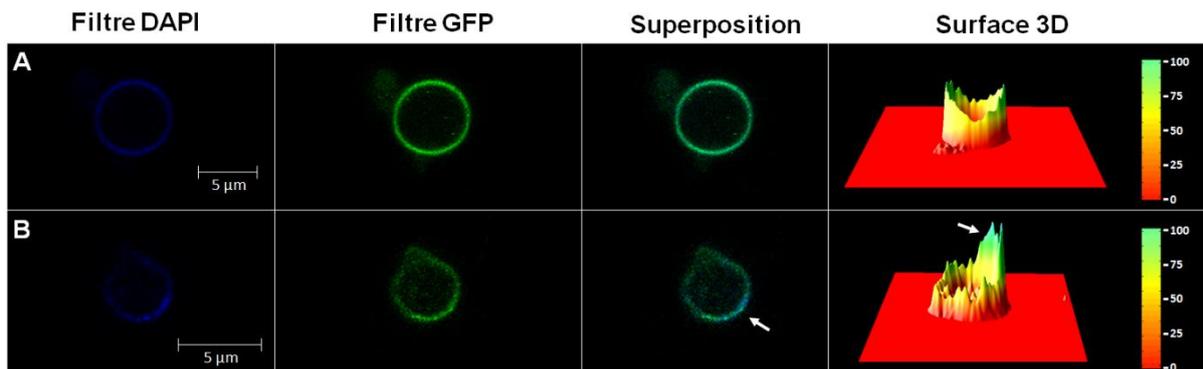


Figure 102 : Visualisation par microscopie confocale de GV, composées de POPC (A) ou d'un mélange de POPC / POPA pour un rapport 80 / 20 (B), en utilisant les filtres DAPI (435-485 nm) ou GFP (500-550 nm), en présence de 0,2 mM de 8HQ5S12N et de 20 mM de Ca^{2+} , dans un tampon Tris/Bicine à pH 8. Les images obtenues ont été superposées à l'aide du logiciel Image J afin de tracer leur surface 3D (l'échelle verticale représente l'intensité de fluorescence).

Ainsi, dans cette expérience préliminaire, l'utilisation du filtre DAPI apparaît adaptée à la visualisation de la fluorescence du complexe POPA/Ca²⁺/8HQ5S12N, qui présente un maximum d'émission à 460 nm (Figure 100B). Le filtre GFP permettrait, quant à lui, de visualiser la fluorescence de la 8HQ5S12N en présence de POPC, puisque son maximum d'émission est centré autour de 490-500 nm (Figure 100B). Néanmoins, il est important de noter que la 8HQ5S12N est tout de même fluorescente à 460 nm, en présence de POPC, et à 500 nm, en présence de POPA (Figure 100B). Ainsi, que ce soit en présence de POPC (Figure 102A) ou en présence de POPA (Figure 102B), la 8HQ5S12N présente une fluorescence qui est observable avec les deux filtres.

Cependant, comme on peut l'observer sur la Figure 100B, en présence de POPA, l'intensité de fluorescence de la 8HQ5S12N est supérieure à 460 nm par rapport à celle obtenue à 500 nm. *A contrario*, en présence de POPC, l'intensité de fluorescence de la 8HQ5S12N est supérieure à 500 nm par rapport à celle obtenue à 460 nm. De plus, comme le montre le spectre du complexe POPA/Ca²⁺/8HQ5S12N, en présence de POPA, la 8HQ5S12N présente une intensité de fluorescence supérieure à celle obtenue avec la POPC. Ainsi, la comparaison des signaux obtenus avec les filtres DAPI et GFP, pour les deux types de GVs (Figure 102), permet d'apprécier la différence de fluorescence de la 8HQ5S12N, en absence (Figure 102A) ou en présence (Figure 102B) de POPA.

En effet, comme on peut l'observer sur la Figure 102A la superposition des images obtenues avec les filtres DAPI et GFP, en présence de POPC seule, conduit à l'obtention d'une combinaison équilibrée des deux couleurs. À l'inverse, la superposition des images obtenues avec le mélange POPC / POPA (Figure 102B), conduit à l'obtention d'un mélange irrégulier des deux couleurs. Ainsi, en présence de POPA, on peut notamment observer de l'apparition de zones bleues (Figure 102B, flèches) qui se démarquent du reste des vésicules. Ces zones bleues proviendraient vraisemblablement de domaines riches en PA, qui se forment en présence de Ca²⁺. En effet, ce phénomène a notamment été montré lors de la caractérisation de l'activité de la ScPLD à l'interface de films monomoléculaires par microscopie à l'angle de Brewster (Wagner *et al.*, 2007).

Par conséquent, ces résultats préliminaires indiquent que l'utilisation de la 8HQ5S12N semble être adaptée à la détection du PA dans les membranes. Néanmoins, l'utilisation de filtres pour visualiser la fluorescence du complexe POPA/Ca²⁺/8HQ5S12N apparaît inadéquate dans ce contexte. En effet, bien qu'une différence de fluorescence soit observable entre la POPC et le POPA, l'utilisation d'un microscope confocal doté d'un monochromateur, apparaît beaucoup plus adapté à ce type d'expérience. En effet, à la différence des appareillages à filtres, qui présentent une gamme spectrale d'émission fixe, les détecteurs à monochromateurs permettent, quant à eux, de sélectionner la longueur

d'onde ainsi que la largeur de la bande passante désirée pour les visualisations. Ces détecteurs se comportent ainsi comme des fluorimètres, et permettent d'obtenir des signaux beaucoup plus précis qu'avec des filtres. Dans ce cas, la visualisation du PA pourrait être effectuée à une longueur d'onde de 420 nm, avec une bande passante de 10 nm (415 – 425 nm), où la 8HQ5S12N présente une intensité de fluorescence importante en présence de POPA et très faible en présence de POPC.

3.2.9. Conclusion

Les travaux effectués durant cette seconde partie de thèse ont permis d'atteindre les principaux objectifs initialement fixés. En effet, le but initial de ce travail était de développer une nouvelle méthode de mesure des activités PLD, capable de pallier les faiblesses des tests actuels. Dans le cadre de ce travail, nous avons sélectionné la 8HQ, précédemment utilisée pour le suivi des activités kinase (Cf. 1.8.5.3.), lors de son incorporation dans des peptides synthétiques. En effet, la 8HQ présente la propriété de détecter les groupements phosphates, tels que celui présent dans le PA, en présence d'ions métalliques, tels que le calcium (métal alcalino-terreux). C'est pourquoi, nous avons examiné la capacité de la 8HQ à détecter le PA, *via* sa propriété d'amplification de fluorescence par chélation.

Ainsi, dans les conditions expérimentales optimisées, la 8HQ se révèle être particulièrement efficace pour la détection et la quantification de manière directe du PA généré par la PLD. Par conséquent, l'utilisation de la 8HQ permet dorénavant le suivi des activités PLD de manière simple et en continu. De plus, ce test présente l'avantage de permettre l'étude de la préférence de substrats de la PLD, vis-à-vis de la tête polaire des phospholipides. Ceci est d'autant plus vrai pour la PS qui est, à l'instar du PA, détectée par les sondes fluorescentes basées sur le suivi du potentiel électrostatique des membranes. Par conséquent, la stratégie de détection du groupement phosphate du PA s'est révélée être un choix judicieux, en termes de spécificité de détection.

Par ailleurs, la possibilité d'utilisation de ce test enzymatique à l'échelle d'une microplaque permet dorénavant le suivi de l'inhibition des PLDs par plusieurs dizaines de molécules bioactives en parallèle, autorisant ainsi le criblage d'inhibiteurs. Ceci est d'autant plus vrai pour le dérivé 8HQ5S12N, synthétisé durant ce travail, qui présente une plus grande sensibilité, permettant ainsi de suivre l'inhibition de PLDs faiblement actives.

Enfin, les expériences préliminaires permettent d'envisager l'utilisation de cette nouvelle sonde pour le suivi des activités PLD, à l'interface de vésicules géantes, par microscopie confocale.

Conclusion générale et perspectives

Le premier objectif de ce travail de thèse consistait à comparer les propriétés biochimiques des AtPLD α et - β avec celles de leurs domaines C2 respectifs, dans le but de mieux comprendre leurs mécanismes de régulation. Pour cela, les premières étapes de ce travail ont consisté à exprimer ces protéines en système bactérien.

Néanmoins, l'expression des AtPLD α et - β dans ce système n'a pas abouti à l'obtention d'enzymes catalytiquement actives. C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers l'utilisation du système d'expression *P. pastoris*, précédemment rapporté comme étant capable d'exprimer la VuPLD α recombinante, de manière active (Ben Ali *et al.*, 2007). Ainsi, l'expression de l'AtPLD α recombinante dans ce système eucaryote a permis l'obtention d'une enzyme fonctionnelle, confirmant que l'utilisation de *P. pastoris* est adaptée à l'expression recombinante des PLDs de plantes.

Par ailleurs, le séquençage des résidus N-terminaux de l'AtPLD α recombinante a permis d'observer la présence d'un clivage se situant en amont du brin β 2 de son domaine C2. De manière intéressante, ce type de clivage apparaît très similaire à celui observé pour la VuPLD α , exprimée chez *P. pastoris*, mais également observé pour les RcPLD α , OsPLD α , GmPLD α , HaPLD α , ainsi que pour les BoPLD α 1 et BoPLD α 2, purifiées à partir de sources naturelles. Ce résultat apparaît d'autant plus intéressant que les PLDs de type α présentent des N-glycosylations, qui indiquent un transit *via* le système endomembranaire. Ainsi, la partie N-terminale des PLD α pourrait agir comme peptide signal, celle-ci présentant, par ailleurs, deux leucines pouvant former un motif di-leucine non acide (le motif étant complet chez les AtPLD α 2 et 3), impliqué dans l'adressage des protéines à la vacuole (Xiang *et al.*, 2013). Par ailleurs, ce peptide pourrait être retiré par l'action d'aspartate protéinases, telles que la cardosine A, qui présente des homologues chez *A. thaliana* mais également chez *P. pastoris*.

Néanmoins, bien que cette explication reste hypothétique, nous nous sommes interrogés sur l'impact d'un tel clivage sur la fonctionnalité des domaines C2. Pour cela, les domaines C2 des AtPLD α et - β (C2 α et C2 β) ainsi que la forme mature du domaine C2 de l'AtPLD α (mC2 α) et du domaine C2 β équivalent (mC2 β), ont été exprimés chez *E. coli*. Cependant, une expression de ces protéines sous forme de corps d'inclusions a été observée, obligeant leur solubilisation en présence d'agents chaotropiques, suivie de leurs renaturations. Ainsi, malgré une purification des domaines en conditions dénaturantes, leur renaturation par dilution rapide semble efficace, comme l'attestent les résultats de fluorescence et de dichroïsme circulaire. Cette méthode présente l'avantage d'éviter la formation d'intermédiaires de renaturation, qui tendent à s'agréger lorsque la concentration en agent chaotrope diminue lentement.

Ainsi, l'étude de l'interaction de ces domaines avec les phospholipides a conduit à des résultats différents, en fonction de la présence ou de l'absence de la partie N-terminale. En effet, tandis que les domaines C2 α et C2 β sont capables de fixer la PC et la PE de manière Ca²⁺-indépendante, les mC2 α et mC2 β apparaissent, quant à eux, capables d'interagir avec les phospholipides anioniques de manière Ca²⁺-dépendante. Ce comportement pourrait s'expliquer par la présence d'une hélice amphipathique dans le peptide N-terminal, qui permettrait ainsi une interaction Ca²⁺-indépendante des domaines C2 entiers avec les membranes. Par ailleurs, tous les domaines apparaissent capables d'interagir avec le PG suggérant ainsi la présence d'un second site de fixation aux membranes. Ce second site de fixation pourrait correspondre au motif polybasique, tel que démontré sur la structure 3D du domaine C2 de la PKC α (Cf. 1.6.2., Figure 32). De plus, ce second site permettrait également d'expliquer la légère fixation Ca²⁺-indépendante des domaines mC2 α et mC2 β aux vésicules de PS et de PA (Cf. 1.6.2., Figure 32).

Ces travaux de recherche ont permis de mettre à jour les propriétés d'adsorption des domaines C2 aux membranes, ainsi que le développement d'un système efficace pour l'expression fonctionnelle de l'AtPLD α . Par conséquent, les futurs travaux de recherche devront en particulier s'axer sur la poursuite des études de purification de l'AtPLD α . Ainsi, l'expression d'une nouvelle construction de l'AtPLD α , présentant une étiquette 6xHis en position N-terminale, est en cours de réalisation. Les résultats préliminaires indiquent la présence d'un clivage d'au moins 90% de l'étiquette, dans la souche sauvage de *P. pastoris*, tandis que l'étude de souches déficientes pour diverses protéases est également en cours de réalisation.

Par ailleurs, le système *P. pastoris* pourra également servir à l'expression des domaines C2 seuls, permettant ainsi d'éviter les manipulations de dénaturation / renaturation. Pour mieux comprendre l'adsorption des PLDs aux interfaces, la caractérisation de l'interaction de ces domaines pourra, de plus, être effectuée *via* des études d'adsorption / pénétration de ces domaines à l'interface lipidique. La technique des films monomoléculaires est un modèle membranaire artificiel particulièrement adaptée pour étudier les interactions protéines/lipides par la mesure des variations de la pression superficielle de la monocouche (Cf. Figure 50). Cette technique pourra être utilisée pour effectuer une étude comparative de l'adsorption/pénétration des domaines C2 tronqués ainsi que les mC2 α et mC2 β sur une monocouche lipidique pré-étalée à l'interface air/eau. La mesure de la variation de la pression superficielle sera faite à différentes pressions initiales, en présence ou absence de Ca²⁺ dans la phase aqueuse. Il sera possible de déterminer la pression initiale du film lipidique au-delà de laquelle aucune augmentation de pression n'est induite par l'injection de la protéine. Cette pression, appelée pression critique, est une donnée caractéristique d'une

protéine interagissant avec les lipides. Cette caractéristique pourra être étudiée pour les divers mutants modifiés au niveau du domaine C2 et l'on pourra aussi évaluer le rôle de l'hydrophobicité et des charges présentes dans les boucles fonctionnelles du domaine C2, CBR1, CBR2 et CBR3. Enfin, le système *P. pastoris* pourra être utilisé pour l'expression de l'AtPLD β , en présence ou en absence du domaine P/Y, mais également des autres types de PLDs d'*Arabidopsis thaliana*, qui n'ont pas encore été entièrement caractérisées.

Ces PLDs pourront alors être caractérisées, en termes d'activité catalytique et de préférence de substrat, grâce au nouveau test enzymatique développé au cours de ce travail de thèse. En effet, ce test présente des avantages incontestables par rapport aux tests disponibles actuellement. Ainsi, l'utilisation de méthodes basées sur le dosage de la tête polaire, libérée lors de la réaction d'hydrolyse catalysée par la PLD, limite grandement les travaux de caractérisation enzymatique. En effet, ces méthodes sont, d'une part, limitées à l'utilisation d'un seul substrat et ne permettent pas, d'autre part, d'apprécier les effets induits par la présence d'alcools primaires, eux-mêmes substrats, sur l'activité PLD.

Ainsi, le dosage direct du PA libéré par l'action de la PLD sur les phospholipides permet une réelle caractérisation de l'activité enzymatique de la PLD, notamment concernant sa préférence de substrat vis-à-vis de la tête polaire des phospholipides. En effet, tandis que beaucoup de tests utilisent la PC en tant que substrat pour la mesure des activités d'enzymes intracellulaires, il est important de noter que les membranes cellulaires présentent une asymétrie, la PC étant principalement localisée sur le feuillet externe de la membrane plasmique, et la PE sur le feuillet interne (Cf. Figure 7).

Par ailleurs, la mesure l'inhibition compétitive de la génération de PA par les alcools primaires vers la formation de phosphatidylalcool présente l'avantage de permettre le suivi de la réaction de transphosphatidylolation, catalysée par la PLD. Cette réaction constitue un enjeu important dans la caractérisation enzymatique de la PLD et présente un fort potentiel industriel pour la synthèse non-chimique de nouveaux phospholipides.

De plus, le test développé dans ce travail présente l'avantage, par rapport aux autres méthodes de dosage du PA, d'être continu, simplifiant ainsi les mesures d'activités. Ce test est, en outre, utilisable à l'échelle d'une plaque de microtitration et par conséquent, apparaît tout à fait adapté au criblage d'inhibiteurs de PLD mais également de nouvelles activités PLD, y compris dans des lysats cellulaires. Ainsi, cette propriété a notamment été mise à contribution dans le cadre du criblage d'inhibiteurs potentiels de la PLD, à partir de la chimiothèque de l'ICBMS (plus de 3 000 molécules testées) et qui a permis d'identifier de nouveaux composés actifs sur la PLD.

Enfin, la substitution d'un groupement dodécylsulfonamide en position 5' de la 8HQ, permet d'augmenter drastiquement le signal de fluorescence lors de la détection du PA. Ainsi, ce dérivé pourra probablement être utilisé, dans le futur, pour le suivi de faibles activités PLDs, telles que celles des PLDs humaines. Par ailleurs, grâce à sa capacité d'ancrage dans les membranes, la 8HQ5S12N autorise la visualisation de domaines riches en PA sur des vésicules géantes, par microscopie confocale. En effet, bien que les résultats obtenus ne soient que préliminaires, ceux-ci n'en restent pas moins très encourageants et nous invitent à poursuivre les efforts engagés. L'accomplissement de ces travaux permettra, *in fine*, de suivre l'activité PLD à l'interface de vésicules géantes et de visualiser ses effets, par microscopie confocale.

Références bibliographiques

A

Abdelkafi, S. et A. Abousalham (2011a), "Kinetic study of sunflower phospholipase Dalpha: interactions with micellar substrate, detergents and metals." Plant Physiology and Biochemistry **49** (7), 752-757.

Abdelkafi, S. et A. Abousalham (2011b), "The substrate specificities of sunflower and soybean phospholipases D using transphosphatidylolation reaction." Lipids in Health and Disease **10**, 196.

Abergel, C., A. Abousalham, S. Chenivresse, M. Riviere, A. M. Moustacas-Gardies et R. Verger (2001), "Crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **57** (Pt 2), 320-322.

Abousalham, A., M. G. Ivanova, I. Douchet et R. Verger (1996), "A new method for determining phospholipase D activity using the monomolecular film technique." Chemistry and Physics of Lipids **79** (2), 107-112.

Abousalham, A., J. Nari, M. Teissere, N. Ferte, G. Noat et R. Verger (1997), "Study of fatty acid specificity of sunflower phospholipase D using detergent/phospholipid micelles." European Journal of Biochemistry **248** (2), 374-379.

Abousalham, A., M. Riviere, M. Teissere et R. Verger (1993), "Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage." Biochimica et Biophysica Acta **1158** (1), 1-7.

Abousalham, A., M. Teissere, A. M. Gardies, R. Verger et G. Noat (1995), "Phospholipase D from soybean (*Glycine max* L.) suspension-cultured cells: purification, structural and enzymatic properties." Plant & Cell Physiology **36** (6), 989-996.

Ahmed, S., J. Lee, R. Kozma, A. Best, C. Monfries et L. Lim (1993), "A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. The p21rac-GTPase activating protein n-chimaerin." The Journal of Biological Chemistry **268** (15), 10709-10712.

Andreyev, A. Y., E. Fahy, Z. Guan, S. Kelly, X. Li, J. G. McDonald, S. Milne, D. Myers, H. Park, A. Ryan, B. M. Thompson, E. Wang, Y. Zhao, H. A. Brown, A. H. Merrill, C. R. Raetz, D. W. Russell, S. Subramaniam et E. A. Dennis (2010), "Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages." Journal of Lipid Research **51** (9), 2785-2797.

Anthony, R. G., R. Henriques, A. Helfer, T. Meszaros, G. Rios, C. Testerink, T. Munnik, M. Deak, C. Koncz et L. Bogre (2004), "A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis." The EMBO Journal **23** (3), 572-581.

Aris, J. P., P. V. Basta, W. D. Holmes, L. M. Ballas, C. Moomaw, N. B. Rankl, G. Blobel, C. R. Loomis et D. J. Burns (1993), "Molecular and biochemical characterization of a recombinant human PKC-delta family member." Biochimica et Biophysica Acta **1174** (2), 171-181.

B

Bai, X., F. Cerimele, M. Ushio-Fukai, M. Waqas, P. M. Campbell, B. Govindarajan, C. J. Der, T. Battle, D. A. Frank, K. Ye, E. Murad, W. Dubiel, G. Soff et J. L. Arbiser (2003), "Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo." The Journal of Biological Chemistry **278** (37), 35501-35507.

Bailey, L. J., V. Choudhary, P. Merai et W. B. Bollag (2014), "Preparation of primary cultures of mouse epidermal keratinocytes and the measurement of phospholipase D activity." Methods in Molecular Biology **1195**, 111-131.

Baillie, G. S., E. Huston, G. Scotland, M. Hodgkin, I. Gall, A. H. Peden, C. MacKenzie, E. S. Houslay, R. Currie, T. R. Pettitt, A. R. Walmsley, M. J. Wakelam, J. Warwicker et M. D. Houslay (2002), "TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca²⁺-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid." The Journal of Biological Chemistry **277** (31), 28298-28309.

Balasubramanian, K., B. Mirnikjoo et A. J. Schroit (2007), "Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis." The Journal of Biological Chemistry **282** (25), 18357-18364.

Bardez, E., I. Devol, B. Larrey et B. Valeur (1997), "Excited-State Processes in 8-Hydroxyquinoline: Photoinduced Tautomerization and Solvation Effects." The Journal of Physical Chemistry **101** (39), 7786-7793.

Bargmann, B. O., A. M. Laxalt, B. ter Riet, B. van Schooten, E. Merquiol, C. Testerink, M. A. Haring, D. Bartels et T. Munnik (2009), "Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants." Plant & Cell Physiology **50** (1), 78-89.

Bateman, A. et R. Sandford (1999), "The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle." Current Biology **9** (16), R588-590.

Baudier, J., J. C. Deloulme, A. Van Dorsselaer, D. Black et H. W. Matthes (1991), "Purification and characterization of a brain-specific protein kinase C substrate, neurogranin (p17). Identification of a consensus amino acid sequence between neurogranin and neuromodulin (GAP43) that corresponds to the protein kinase C phosphorylation site and the calmodulin-binding domain." The Journal of Biological Chemistry **266** (1), 229-237.

Ben-Efraim, I., Q. Zhou, T. Wiedmer, L. Gerace et P. J. Sims (2004), "Phospholipid scramblase 1 is imported into the nucleus by a receptor-mediated pathway and interacts with DNA." Biochemistry **43** (12), 3518-3526.

Ben Ali, Y., F. Carriere et A. Abousalham (2007), "High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)." Protein Expression and Purification **51** (2), 162-169.

Bokoch, G. M., A. M. Reilly, R. H. Daniels, C. C. King, A. Olivera, S. Spiegel et U. G. Knaus (1998), "A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids." The Journal of Biological Chemistry **273** (14), 8137-8144.

Bollag, G. et F. McCormick (1991), "Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities." Nature **351** (6327), 576-579.

Bonifacino, J. S. et B. S. Glick (2004), "The mechanisms of vesicle budding and fusion." Cell **116** (2), 153-166.

Bradford, M. M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**, 248-254.

Brown, M. T., J. Andrade, H. Radhakrishna, J. G. Donaldson, J. A. Cooper et P. A. Randazzo (1998), "ASAP1, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src." Molecular Biology of the Cell **18** (12), 7038-7051.

Bruntz, R. C., C. W. Lindsley et H. A. Brown (2014a), "Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer." Pharmacological Reviews **66** (4), 1033-1079.

Bruntz, R. C., H. E. Taylor, C. W. Lindsley et H. A. Brown (2014b), "Phospholipase D2 mediates survival signaling through direct regulation of Akt in glioblastoma cells." The Journal of Biological Chemistry **289** (2), 600-616.

C

Cen, Y., Y. M. Wu, X. J. Kong, S. Wu, R. Q. Yu et X. Chu (2014), "Phospholipid-modified upconversion nanoprobe for ratiometric fluorescence detection and imaging of phospholipase D in cell lysate and in living cells." *Analytical Chemistry* **86** (14), 7119-7127.

Chae, Y. C., J. H. Kim, K. L. Kim, H. W. Kim, H. Y. Lee, W. D. Heo, T. Meyer, P. G. Suh et S. H. Ryu (2008), "Phospholipase D activity regulates integrin-mediated cell spreading and migration by inducing GTP-Rac translocation to the plasma membrane." *Molecular Biology of the Cell* **19** (7), 3111-3123.

Chahinian, H., B. Sias et F. Carriere (2000), "The C-terminal domain of pancreatic lipase: functional and structural analogies with C2 domains." *Current Protein and Peptide Science* **1** (1), 91-103.

Chang, I. F., A. Curran, R. Woolsey, D. Quilici, J. C. Cushman, R. Mittler, A. Harmon et J. F. Harper (2009), "Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*." *Proteomics* **9** (11), 2967-2985.

Chapman, E. R. et R. Jahn (1994), "Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain." *The Journal of Biological Chemistry* **269** (8), 5735-5741.

Cho, W. et R. V. Stahelin (2006), "Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains." *Biochimica et Biophysica Acta* **1761** (8), 838-849.

Choi, S. Y., P. Huang, G. M. Jenkins, D. C. Chan, J. Schiller et M. A. Frohman (2006), "A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis." *Nature Cell Biology* **8** (11), 1255-1262.

Chu, M., M. G. Patel, J.-K. Pai, P. R. Das et M. S. Puar (1996), "Sch 53823 and Sch 53825, novel fungal metabolites with phospholipase D inhibitory activity." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **6** (5), 579-584.

Chu, M., I. Truumees, M. G. Patel, V. P. Gullo, J.-K. Pai, P. R. Das et M. S. Puar (1994), "Two new phospholipase d inhibitors, sch 49211 and sch 49212, produced by the fungus *nattrasia mangirferae*." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **4** (12), 1539-1542.

Chuang, T. H., B. P. Bohl et G. M. Bokoch (1993), "Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation." *The Journal of Biological Chemistry* **268** (35), 26206-26211.

Clark, A. M., A. S. El-Feraly et W.-S. Li (1981), "Antimicrobial Activity of Phenolic Constituents of *Magnolia Grandiflora* L." Journal of Pharmaceutical Sciences **70** (8), 951-952.

Combet, C., M. Jambon, G. Deleage et C. Geourjon (2002), "Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein." Bioinformatics **18** (1), 213-214.

Contreras, F. X., L. Sanchez-Magraner, A. Alonso et F. M. Goni (2010), "Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes." FEBS Letters **584** (9), 1779-1786.

Corbalan-Garcia, S., S. Sanchez-Carrillo, J. Garcia-Garcia et J. C. Gomez-Fernandez (2003), "Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC epsilon." Biochemistry **42** (40), 11661-11668.

Coronado, M. A., A. Ullah, L. S. Silva, D. Chaves-Moreira, L. Vuitika, O. M. Chaim, S. S. Veiga, J. Chahine, M. T. Murakami et R. K. Arni (2015), "Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D." Current Protein & Peptide Science **16** (8), 768-774.

Cruz-Ramirez, A., A. Oropeza-Aburto, F. Razo-Hernandez, E. Ramirez-Chavez et L. Herrera-Estrella (2006), "Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103** (17), 6765-6770.

Cuevas, W. A. et J. G. Songer (1993), "Arcanobacterium haemolyticum phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D." Infection and immunity **61** (10), 4310-4316.

D'Arrigo, P., V. Piergianni, D. Scarcelli et S. Servi (1995), "A spectrophotometric assay for phospholipase D." Analytica Chimica Acta **304** (2), 249-254.

D

Dawson, R. M. (1967), "The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D." The Biochemical Journal **102** (1), 205-210.

Dawson, R. M. et N. Hemington (1967), "Some properties of purified phospholipase D and especially the effect of amphipathic substances." The Biochemical Journal **102** (1), 76-86.

DeBurman, S. K., J. Ptasienski, E. Boetticher, J. W. Lomasney, J. L. Benovic et M. M. Hosey (1995), "Lipid-mediated regulation of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3." The Journal of Biological Chemistry **270** (11), 5742-5747.

Dennis, E. A., J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magrioti et G. Kokotos (2011), "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention." Chemical Reviews **111** (10), 6130-6185.

Devaiah, S. P., X. Pan, Y. Hong, M. Roth, R. Welti et X. Wang (2007), "Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in Arabidopsis." The Plant Journal **50** (6), 950-957.

DeYonker, N. J. et C. E. Webster (2013), "Phosphoryl transfers of the phospholipase D superfamily: a quantum mechanical theoretical study." Journal of the American Chemical Society **135** (37), 13764-13774.

Dippe, M. et R. Ulbrich-Hofmann (2009a), "Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity." Analytical Biochemistry **392** (2), 169-173.

Dippe, M. et R. Ulbrich-Hofmann (2009b), "Substrate specificity in phospholipid transformations by plant phospholipase D isoenzymes." Phytochemistry **70** (3), 361-365.

Do le, D., R. Buchet, S. Pikula, A. Abousalham et S. Mebarek (2012), "Direct determination of phospholipase D activity by infrared spectroscopy." Analytical Biochemistry **430** (1), 32-38.

Dominguez, A., A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias et L. Montenegro (1997), "Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques." Journal of Chemical Education **74** (10), 1227.

Duportail, G., A. Klymchenko, Y. Mely et A. Demchenko (2001), "Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes." FEBS Letters **508** (2), 196-200.

E

Eibl, H. et S. Kovatchev (1981), "Preparation of phospholipids and their analogs by phospholipase D." Methods in Enzymology **72**, 632-639.

El Bawab, S., O. Macovschi, C. Sette, M. Conti, M. Lagarde, G. Nemoz et A. F. Prigent (1997), "Selective stimulation of a cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4A5) isoform by phosphatidic acid molecular species endogenously formed in rat thymocytes." European Journal of Biochemistry **247** (3), 1151-1157.

El Maarouf, H., F. Carriere, M. Riviere et A. Abousalham (2000), "Functional expression in insect cells, one-step purification and characterization of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)." Protein Engineering **13** (11), 811-817.

Ella, K. M., K. E. Meier, A. Kumar, Y. Zhang et G. P. Meier (1997), "Utilization of alcohols by plant and mammalian phospholipase D." Biochemistry and Molecular Biology International **41** (4), 715-724.

Epand, R. M., R. F. Epand, B. Berno, L. Pelosi et G. Brandolin (2009), "Association of phosphatidic acid with the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier." Biochemistry **48** (51), 12358-12364.

Essen, L. O., O. Perisic, R. Cheung, M. Katan et R. L. Williams (1996), "Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta." Nature **380** (6575), 595-602.

F

Fahy, E., S. Subramaniam, R. C. Murphy, M. Nishijima, C. R. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. J. Wakelam et E. A. Dennis (2009), "Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids." Journal of Lipid Research **50 Suppl**, S9-14.

Fan, L., S. Zheng, D. Cui et X. Wang (1999), "Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase D α , D β , and D γ in Arabidopsis." Plant Physiology **119** (4), 1371-1378.

Fan, L., S. Zheng et X. Wang (1997), "Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves." The Plant Cell **9** (12), 2183-2196.

Finkelstein, C. V., M. Overduin et D. G. Capelluto (2006), "Cell migration and signaling specificity is determined by the phosphatidylserine recognition motif of Rac1." The Journal of Biological Chemistry **281** (37), 27317-27326.

Folch, J., M. Lees et G. H. Sloane Stanley (1957), "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." The Journal of Biological Chemistry **226** (1), 497-509.

Forte, G. M., M. R. Pool et C. J. Stirling (2011), "N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum." PLoS Biol **9** (5), e1001073.

Foster, D. A. et L. Xu (2003), "Phospholipase D in cell proliferation and cancer." Molecular Cancer Research **1** (11), 789-800.

Foxwell, B. M. et B. Ruffel (1990), "The mechanisms of action of cyclosporine." Cardiology Clinics **8** (1), 107-117.

Frank, C., H. Keilhack, F. Opitz, O. Zschörnig et F.-D. Böhmer (1999), "Binding of Phosphatidic Acid to the Protein-Tyrosine Phosphatase SHP-1 as a Basis for Activity Modulation." Biochemistry **38** (37), 11993-12002.

Fraser, R. S. et J. Creanor (1975), "The mechanism of inhibition of ribonucleic acid synthesis by 8-hydroxyquinoline and the antibiotic lomofungin." The Biochemical Journal **147** (3), 401-410.

Frohman, M. A. (2015), "The phospholipase D superfamily as therapeutic targets." Trends in Pharmacological Sciences **36** (3), 137-144.

Fujiwara, M., T. Uemura, K. Ebine, Y. Nishimori, T. Ueda, A. Nakano, M. H. Sato et Y. Fukao (2014), "Interactomics of Qa-SNARE in Arabidopsis thaliana." Plant & Cell Physiology **55** (4), 781-789.

Fujiwara, Y. (2008), "Cyclic phosphatidic acid - a unique bioactive phospholipid." Biochimica et Biophysica Acta **1781** (9), 519-524.

G

Garcia, A., Y. Zheng, C. Zhao, A. Toschi, J. Fan, N. Shraibman, H. A. Brown, D. Bar-Sagi, D. A. Foster et J. L. Arbiser (2008), "Honokiol suppresses survival signals mediated by Ras-dependent phospholipase D activity in human cancer cells." Clinical Cancer Research **14** (13), 4267-4274.

Geng, D., J. Chura et M. F. Roberts (1998), "Activation of phospholipase D by phosphatidic acid. Enhanced vesicle binding, phosphatidic acid-Ca²⁺ interaction, or an allosteric effect?" The Journal of Biological Chemistry **273** (20), 12195-12202.

Ghosh, S., S. Moore, R. M. Bell et M. Dush (2003), "Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos." The Journal of Biological Chemistry **278** (46), 45690-45696.

Gibson, T. J., M. Hyvonen, A. Musacchio, M. Saraste et E. Birney (1994), "PH domain: the first anniversary." Trends in Biochemical Sciences **19** (9), 349-353.

Gilson, M., T. Straatsma, J. McCammon, D. Ripoll, C. Faerman, P. Axelsen, I. Silman et J. Sussman (1994), "Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase." Science **263** (5151), 1276-1278.

Giron-Calle, J. et H. J. Forman (2000), "Phospholipase D and priming of the respiratory burst by H₂O₂ in NR8383 alveolar macrophages." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **23** (6), 748-754.

Gookin, T. E. et S. M. Assmann (2014), "Significant reduction of BiFC non-specific assembly facilitates in planta assessment of heterotrimeric G-protein interactors." The Plant Journal **80** (3), 553-567.

Gorter, E. et F. Grendel (1925), "On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood." The Journal of Experimental Medicine **41** (4), 439-443.

Grange, M., C. Sette, M. Cuomo, M. Conti, M. Lagarde, A. F. Prigent et G. Nemoz (2000), "The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 is regulated by phosphatidic acid binding. Consequences for cAMP signaling pathway and characterization of a phosphatidic acid binding site." The Journal of Biological Chemistry **275** (43), 33379-33387.

Green, D. R. (2011), Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Greenfield, N. J. (2006), "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure." Nature Protocols **1** (6), 2876-2890.

Guerrero-Valero, M., C. Ferrer-Orta, J. Querol-Audi, C. Marin-Vicente, I. Fita, J. C. Gomez-Fernandez, N. Verdaguer et S. Corbalan-Garcia (2009), "Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106** (16), 6603-6607.

Guillouard, I., P. M. Alzari, B. Saliou et S. T. Cole (1997), "The carboxy-terminal C2-like domain of the alpha-toxin from *Clostridium perfringens* mediates calcium-dependent membrane recognition." Molecular Microbiology **26** (5), 867-876.

Guo, L., S. P. Devaiah, R. Narasimhan, X. Pan, Y. Zhang, W. Zhang et X. Wang (2012a), "Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D δ to transduce hydrogen peroxide signals in the Arabidopsis response to stress." The Plant Cell **24** (5), 2200-2212.

Guo, L. et X. Wang (2012b), "Crosstalk between Phospholipase D and Sphingosine Kinase in Plant Stress Signaling." Frontiers In Plant Science **3**, 51.

H

Ha, E. E. et M. A. Frohman (2014), "Regulation of mitochondrial morphology by lipids." Biofactors **40** (4), 419-424.

Hammond, S. M., Y. M. Altshuller, T. C. Sung, S. A. Rudge, K. Rose, J. Engebrecht, A. J. Morris et M. A. Frohman (1995), "Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family." The Journal of Biological Chemistry **270** (50), 29640-29643.

Han, J. M., Y. Kim, J. S. Lee, C. S. Lee, B. D. Lee, M. Ohba, T. Kuroki, P. G. Suh et S. H. Ryu (2002), "Localization of phospholipase D1 to caveolin-enriched membrane via palmitoylation: implications for epidermal growth factor signaling." Molecular Biology of the Cell **13** (11), 3976-3988.

Hanahan, D. J. et I. L. Chaikoff (1947), "The phosphorus-containing lipides of the carrot." The Journal of Biological Chemistry **168** (1), 233-240.

Hausmann, J., S. Kamtekar, E. Christodoulou, J. E. Day, T. Wu, Z. Fulkerson, H. M. Albers, L. A. van Meeteren, A. J. Houben, L. van Zeijl, S. Jansen, M. Andries, T. Hall, L. E. Pegg, T. E. Benson, M. Kasiem, K. Harlos, C. W. Kooi, S. S. Smyth, H. Ovaa, M. Bollen, A. J. Morris, W. H. Moolenaar et A. Perrakis (2011),

"Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin." Nature Structural & Molecular Biology **18** (2), 198-204.

Hay, N. et N. Sonenberg (2004), "Upstream and downstream of mTOR." Genes & Development **18** (16), 1926-1945.

Hegde, V. D., J. Silver, M. G. Patel, R. Bryant, J. Pai, P. R. Das, M. S. Puar et P. A. Cox (1995), "Phospholipase D Inhibitors from a Myrsine Species." Journal of Natural Products **58** (10), 1492-1497.

Henkels, K. M., G. P. Boivin, E. S. Dudley, S. J. Berberich et J. Gomez-Cambronero (2013), "Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model." Oncogene **32** (49), 5551-5562.

Herman, E. M. et M. J. Chrispeels (1980), "Characteristics and subcellular localization of phospholipase d and phosphatidic Acid phosphatase in mung bean cotyledons." Plant Physiology **66** (5), 1001-1007.

Hong, Y., S. P. Devaiah, S. C. Bahn, B. N. Thamasandra, M. Li, R. Welti et X. Wang (2009), "Phospholipase D epsilon and phosphatidic acid enhance Arabidopsis nitrogen signaling and growth." The Plant Journal **58** (3), 376-387.

Hong, Y., X. Pan, R. Welti et X. Wang (2008), "Phospholipase Dalpha3 is involved in the hyperosmotic response in Arabidopsis." The Plant Cell **20** (3), 803-816.

Honigberg, S. M., C. Conicella et R. E. Esposito (1992), "Commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the SPO14 gene." Genetics **130** (4), 703-716.

Hooke, R. (1665), "Observation XVIII : Of the schematism or texture of cork, and of the cells and pores of some other such frothy bodies." Micrographia.

Hosono, H., J. Aoki, Y. Nagai, K. Bandoh, M. Ishida, R. Taguchi, H. Arai et K. Inoue (2001), "Phosphatidylserine-specific phospholipase A1 stimulates histamine release from rat peritoneal mast cells through production of 2-acyl-1-lysophosphatidylserine." The Journal of Biological Chemistry **276** (32), 29664-29670.

Houben, A. J. et W. H. Moolenaar (2011), "Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer." Cancer Metastasis Reviews **30** (3-4), 557-565.

Houtkooper, R. H. et F. M. Vaz (2008), "Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism." Cellular and Molecular Life Sciences **65** (16), 2493-2506.

Hughes, W. E. et P. J. Parker (2001), "Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity." The Biochemical Journal **356** (Pt 3), 727-736.

I

Ibl, V., E. Csaszar, N. Schlager, S. Neubert, C. Spitzer et M. T. Hauser (2012), "Interactome of the plant-specific ESCRT-III component AtVPS2.2 in Arabidopsis thaliana." Journal of proteome research **11** (1), 397-411.

Inoue, K., H. Arai et J. Aoki (2005), "Phospholipase A1 Structures, Physiological and Patho-physiological Roles in Mammals." 23-39.

Ishiguro, S., A. Kawai-Oda, J. Ueda, I. Nishida et K. Okada (2001), "The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis." The Plant Cell **13** (10), 2191-2209.

Itoh, T., J. Hasegawa, K. Tsujita, Y. Kanaho et T. Takenawa (2009), "The tyrosine kinase Fer is a downstream target of the PLD-PA pathway that regulates cell migration." Science Signaling **2** (87), ra52.

Iwasaki, Y., H. Nakano et T. Yamane (1994), "Phospholipase D from Streptomyces antibioticus: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases." Applied Microbiology and Biotechnology **42** (2-3), 290-299.

J

Jackson, T. R., F. D. Brown, Z. Nie, K. Miura, L. Feroni, J. Sun, V. W. Hsu, J. G. Donaldson et P. A. Randazzo (2000), "ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery." The Journal of cell biology **151** (3), 627-638.

Jain, M. K. et O. G. Berg (1989), "The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting." Biochimica et Biophysica Acta **1002** (2), 127-156.

Johnson, N., K. Powis et S. High (2013), "Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum." Biochim Biophys Acta **1833** (11), 2403-2409.

Jones, A. M., Y. Xuan, M. Xu, R. S. Wang, C. H. Ho, S. Lalonde, C. H. You, M. I. Sardi, S. A. Parsa, E. Smith-Valle, T. Su, K. A. Frazer, G. Pilot, R. Pratelli, G. Grossmann, B. R. Acharya, H. C. Hu, C. Engineer, F. Villiers, C. Ju, K. Takeda,

Z. Su, Q. Dong, S. M. Assmann, J. Chen, J. M. Kwak, J. I. Schroeder, R. Albert, S. Y. Rhee et W. B. Frommer (2014), "Border control - a membrane-linked interactome of Arabidopsis." Science **344** (6185), 711-716.

Jones, G. A. et G. Carpenter (1993), "The regulation of phospholipase C-gamma 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters." The Journal of Biological Chemistry **268** (28), 20845-20850.

Jones, J. A., R. Rawles et Y. A. Hannun (2005), "Identification of a novel phosphatidic acid binding domain in protein phosphatase-1." Biochemistry **44** (40), 13235-13245.

Jones, S. B., L. A. Pfeifer, T. J. Bleisch, T. J. Beauchamp, J. D. Durbin, V. J. Klimkowski, N. E. Hughes, C. J. Rito, Y. Dao, J. M. Gruber, H. Bui, M. G. Chambers, S. Chandrasekhar, C. Lin, D. J. McCann, D. R. Mudra, J. L. Oskins, C. A. Swearingen, K. Thirunavukkarasu et B. H. Norman (2016), "Novel Autotaxin Inhibitors for the Treatment of Osteoarthritis Pain: Lead Optimization via Structure-Based Drug Design." ACS Medicinal Chemistry Letters.

Juneja, L. R., N. Hibi, N. Inagaki, T. Yamane et S. Shimizu (1987), "Comparative study on conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylglycerol by cabbage phospholipase D in micelle and emulsion systems." Enzyme and Microbial Technology **9** (6), 350-354.

Juneja, L. R., T. Kazuoka, N. Goto, T. Yamane et S. Shimizu (1989), "Conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylserine by various phospholipases D in the presence of l- or d-serine." Biochimica et Biophysica Acta **1003** (3), 277-283.

K

Kadamur, G. et E. M. Ross (2013), "Mammalian phospholipase C." Annual Review of Physiology **75**, 127-154.

Kang, D. W., J. Y. Lee, D. H. Oh, S. Y. Park, T. M. Woo, M. K. Kim, M. H. Park, Y. H. Jang et S. Min do (2009), "Triptolide-induced suppression of phospholipase D expression inhibits proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells." Experimental & Molecular Medicine **41** (9), 678-685.

Karathanassis, D., R. V. Stahelin, J. Bravo, O. Perisic, C. M. Pacold, W. Cho et R. L. Williams (2002), "Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction." The EMBO Journal **21** (19), 5057-5068.

Kelley, L. A. et M. J. Sternberg (2009), "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." Nature Protocols **4** (3), 363-371.

Khatoon, H., J. Mansfeld, A. Schierhorn et R. Ulbrich-Hofmann (2015), "Purification, sequencing and characterization of phospholipase D from Indian mustard seeds." Phytochemistry **117**, 65-75.

Kitzen, J. J., M. J. de Jonge, C. H. Lamers, F. A. Eskens, D. van der Biessen, L. van Doorn, J. Ter Steeg, M. Brandely, C. Puozzo et J. Verweij (2009), "Phase I dose-escalation study of F60008, a novel apoptosis inducer, in patients with advanced solid tumours." European Journal of Cancer **45** (10), 1764-1772.

Klymchenko, A. S., G. Duportail, Y. Mely et A. P. Demchenko (2003), "Ultrasensitive two-color fluorescence probes for dipole potential in phospholipid membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100** (20), 11219-11224.

Kolay, S., U. Basu et P. Raghu (2016), "Control of diverse subcellular processes by a single multi-functional lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂]." The Biochemical Journal **473** (12), 1681-1692.

Kooijman, E. E. et K. N. Burger (2009), "Biophysics and function of phosphatidic acid: a molecular perspective." Biochimica et Biophysica Acta **1791** (9), 881-888.

Kooijman, E. E., V. Chupin, N. L. Fuller, M. M. Kozlov, B. de Kruijff, K. N. Burger et P. R. Rand (2005), "Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid." Biochemistry **44** (6), 2097-2102.

Koonin, E. V. (1996), "A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope proteins." Trends in Biochemical Sciences **21** (7), 242-243.

Kuppe, K., A. Kerth, A. Blume et R. Ulbrich-Hofmann (2008), "Calcium-induced membrane microdomains trigger plant phospholipase D activity." Chembiochem **9** (17), 2853-2859.

Kurooka, T., Y. Yamamoto, Y. Takai et T. Sakisaka (2011), "Dual regulation of RA-RhoGAP activity by phosphatidic acid and Rap1 during neurite outgrowth." The Journal of Biological Chemistry **286** (8), 6832-6843.

L

Laemmli, U. K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227** (5259), 680-685.

Lakkaraju, A. K., R. Thankappan, C. Mary, J. L. Garrison, J. Taunton et K. Strub (2012), "Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation." Mol Biol Cell **23** (14), 2712-2722.

Lambrecht, R. et R. Ulbrich-Hofmann (1992), "A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization." Biological chemistry Hoppe-Seyler **373** (2), 81-88.

Laxalt, A. M., B. ter Riet, J. C. Verdonk, L. Parigi, W. I. Taming, J. Vossen, M. Haring, A. Musgrave et T. Munnik (2001), "Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: rapid and specific expression of LePLDbeta1 on elicitation with xylanase." The Plant Journal **26** (3), 237-247.

Lehman, N., B. Ledford, M. Di Fulvio, K. Frondorf, L. C. McPhail et J. Gomez-Cambroneo (2007), "Phospholipase D2-derived phosphatidic acid binds to and activates ribosomal p70 S6 kinase independently of mTOR." FASEB Journal **21** (4), 1075-1087.

Leiros, I., F. Secundo, C. Zambonelli, S. Servi et E. Hough (2000), "The first crystal structure of a phospholipase D." Structure **8** (6), 655-667.

Lemmon, M. A. (2007), "Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides." Biochemical Society Symposium(74), 81-93.

Lemmon, M. A. (2008), "Membrane recognition by phospholipid-binding domains." Nature Reviews. Molecular cell biology **9** (2), 99-111.

Lerchner, A., J. Mansfeld, K. Kuppe et R. Ulbrich-Hofmann (2006), "Probing conserved amino acids in phospholipase D (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for their importance in hydrolysis and transphosphatidyltransferase activity." Protein Engineering, Design & Selection **19** (10), 443-452.

Leventis, P. A. et S. Grinstein (2010), "The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes." Annual Review of Biophysics **39**, 407-427.

Li, G. et H. W. Xue (2007), "Arabidopsis PLDzeta2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response." The Plant Cell **19** (1), 281-295.

Li, L. et N. Fleming (1999), "Aluminum fluoride inhibition of cabbage phospholipase D by a phosphate-mimicking mechanism." FEBS Letters **461** (1-2), 1-5.

Li, M., Y. Hong et X. Wang (2009), "Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants." Biochimica et Biophysica Acta **1791** (9), 927-935.

Li, M., C. Qin, R. Welte et X. Wang (2006), "Double knockouts of phospholipases Dzeta1 and Dzeta2 in Arabidopsis affect root elongation during phosphate-limited growth but do not affect root hair patterning." Plant Physiology **140** (2), 761-770.

Li, W., M. Li, W. Zhang, R. Welte et X. Wang (2004), "The plasma membrane-bound phospholipase Ddelta enhances freezing tolerance in Arabidopsis thaliana." Nature Biotechnology **22** (4), 427-433.

Limatola, C., D. Schaap, W. H. Moolenaar et W. J. van Blitterswijk (1994), "Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isoforms and other acidic lipids." The Biochemical Journal **304 (Pt 3)**, 1001-1008.

Litosch, I. (2003), "Regulation of phospholipase C-beta activity by phosphatidic acid: isoform dependence, role of protein kinase C, and G protein subunits." Biochemistry **42** (6), 1618-1623.

Liu, M. Y., S. Gutowski et P. C. Sternweis (2001), "The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity." The Journal of Biological Chemistry **276** (8), 5556-5562.

Liu, S. J., Q. Wen, L. J. Tang et J. H. Jiang (2012), "Phospholipid-graphene nanoassembly as a fluorescence biosensor for sensitive detection of phospholipase D activity." Analytical Chemistry **84** (14), 5944-5950.

Long, C., R. Odavic et E. J. Sargent (1967), "The action of cabbage-leaf phospholipase D upon lysolecithin." The Biochemical Journal **102** (1), 216-220.

Lopez, O., A. de la Maza, L. Coderch, C. Lopez-Iglesias, E. Wehrli et J. L. Parra (1998), "Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100." FEBS Letters **426** (3), 314-318.

M

Macauley-Patrick, S., M. L. Fazenda, B. McNeil et L. M. Harvey (2005), "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system." Yeast **22** (4), 249-270.

Madesh, M. et K. A. Balasubramanian (1998), "Cyclosporin A inhibits oxidant and calcium stimulated phospholipase D activity in the rat intestinal mitochondria." Biochimica et Biophysica Acta **1389** (3), 206-212.

Magotti, P., I. Bauer, M. Igarashi, M. Babagoli, R. Marotta, D. Piomelli et G. Garau (2015), "Structure of Human N-Acylphosphatidylethanolamine-Hydrolyzing Phospholipase D: Regulation of Fatty Acid Ethanolamide Biosynthesis by Bile Acids." Structure **23** (3), 598-604.

Majd, S., E. C. Yusko, A. D. MacBriar, J. Yang et M. Mayer (2009), "Gramicidin pores report the activity of membrane-active enzymes." Journal of the American Chemical Society **131** (44), 16119-16126.

Majd, S., E. C. Yusko, J. Yang, D. Sept et M. Mayer (2013), "A model for the interfacial kinetics of phospholipase D activity on long-chain lipids." Biophysical Journal **105** (1), 146-153.

Malone, C. D. et G. J. Hannon (2009), "Small RNAs as guardians of the genome." Cell **136** (4), 656-668.

Mane, S. P., C. Vasquez-Robinet, A. A. Sioson, L. S. Heath et R. Grene (2007), "Early PLD α -mediated events in response to progressive drought stress in *Arabidopsis*: a transcriptome analysis." Journal of Experimental Botany **58** (2), 241-252.

Manifava, M., J. W. Thuring, Z. Y. Lim, L. Packman, A. B. Holmes et N. T. Ktistakis (2001), "Differential binding of traffic-related proteins to phosphatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate-coupled affinity reagents." The Journal of Biological Chemistry **276** (12), 8987-8994.

Manning, B. D. et L. C. Cantley (2007), "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129** (7), 1261-1274.

Marsh, D. (1990), CRC handbook of lipid bilayers, CRC Press.

Martin, S. F., R. L. DeBlanc et P. J. Hergenrother (2000), "Determination of the substrate specificity of the phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* via an inorganic phosphate quantitation assay." Analytical Biochemistry **278** (2), 106-110.

McGee, J. D. (2003), "Rice Phospholipase D Isoforms Show Differential Cellular Location and Gene Induction." Plant & Cell Physiology **44** (10), 1013-1026.

Mirnikjoo, B., K. Balasubramanian et A. J. Schroit (2009), "Suicidal membrane repair regulates phosphatidylserine externalization during apoptosis." The Journal of Biological Chemistry **284** (34), 22512-22516.

Mishra, G., W. Zhang, F. Deng, J. Zhao et X. Wang (2006), "A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in Arabidopsis." Science **312** (5771), 264-266.

Monovich, L., B. Mugrage, E. Quadros, K. Toscano, R. Tommasi, S. LaVoie, E. Liu, Z. Du, D. LaSala, W. Boyar et P. Steed (2007), "Optimization of halopemide for phospholipase D2 inhibition." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **17** (8), 2310-2311.

Moreno-Perez, A. J., E. Martinez-Force, R. Garces et J. J. Salas (2010), "Phospholipase Dalpha from sunflower (*Helianthus annuus*): cloning and functional characterization." Journal of Plant Physiology **167** (7), 503-511.

Morris, A. J., J. Engebrecht et M. A. Frohman (1996), "Structure and regulation of phospholipase D." Trends in Pharmacological Sciences **17** (5), 182-185.

Muller, G. et R. Zimmermann (1987), "Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein." EMBO J **6** (7), 2099-2107.

Murthy, S. N., P. H. Chung, L. Lin et J. W. Lomasney (2006), "Activation of phospholipase Cepsilon by free fatty acids and cross talk with phospholipase D and phospholipase A2." Biochemistry **45** (36), 10987-10997.

N

Nakashima, S. (2002), "Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function." Journal of Biochemistry **132** (5), 669-675.

Nakazawa, Y., H. Sato, M. Uchino et K. Takano (2006), "Purification, characterization and cloning of phospholipase D from peanut seeds." The Protein Journal **25** (3), 212-223.

Nalefski, E. A. et J. J. Falke (1996), "The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity." Protein Science **5** (12), 2375-2390.

Nalefski, E. A., M. M. Slazas et J. J. Falke (1997), "Ca²⁺-signaling cycle of a membrane-docking C2 domain." Biochemistry **36** (40), 12011-12018.

Nelson, D. L. et M. M. Cox (2004), Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition, W. H. Freeman.

Nemoz, G., C. Sette et M. Conti (1997), "Selective activation of rolipram-sensitive, cAMP-specific phosphodiesterase isoforms by phosphatidic acid." Molecular Pharmacology **51** (2), 242-249.

Nicolson, G. L. (2014), "The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years." Biochim Biophys Acta **1838** (6), 1451-1466.

Nie, Z., K. T. Stanley, S. Stauffer, K. M. Jacques, D. S. Hirsch, J. Takei et P. A. Randazzo (2002), "AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton." The Journal of Biological Chemistry **277** (50), 48965-48975.

Nishikimi, A., H. Fukuhara, W. Su, T. Hongu, S. Takasuga, H. Mihara, Q. Cao, F. Sanematsu, M. Kanai, H. Hasegawa, Y. Tanaka, M. Shibasaki, Y. Kanaho, T. Sasaki, M. A. Frohman et Y. Fukui (2009), "Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis." Science **324** (5925), 384-387.

Nishizuka, Y. (1988), "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation." Nature **334** (6184), 661-665.

Norris, K. et S. Misra (2014), "Brown recluse spider bite on the breast." Journal of the American Academy of Physician Assistants **27** (5), 32-34.

Novotná, Z., J. Káš, J. Daussant, J. Sajdok et O. Valentová (1999), "Purification and characterisation of rape seed phospholipase D." Plant Physiology and Biochemistry **37** (7-8), 531-537.

O

Ochoa, W. F., S. Corbalan-Garcia, R. Eritja, J. A. Rodriguez-Alfaro, J. C. Gomez-Fernandez, I. Fita et N. Verdaguer (2002), "Additional binding sites for anionic phospholipids and calcium ions in the crystal structures of complexes of the C2 domain of protein kinase calpha." Journal of Molecular Biology **320** (2), 277-291.

Ochoa, W. F., J. Garcia-Garcia, I. Fita, S. Corbalan-Garcia, N. Verdaguer et J. C. Gomez-Fernandez (2001), "Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca(2+)-independent C2 domains." Journal of Molecular Biology **311** (4), 837-849.

Ohashi, Y., A. Oka, R. Rodrigues-Pousada, M. Possenti, I. Ruberti, G. Morelli et T. Aoyama (2003), "Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation." Science **300** (5624), 1427-1430.

Okamoto, Y., J. Morishita, K. Tsuboi, T. Tonai et N. Ueda (2004), "Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners." The Journal of Biological Chemistry **279** (7), 5298-5305.

Osisami, M., W. Ali et M. A. Frohman (2012), "A role for phospholipase D3 in myotube formation." PLoS One **7** (3), e33341.

Otani, Y., Y. Yamaguchi, Y. Sato, T. Furuichi, K. Ikenaka, H. Kitani et H. Baba (2011), "PLD4 is involved in phagocytosis of microglia: expression and localization changes of PLD4 are correlated with activation state of microglia." PLoS One **6** (11), e27544.

Ouyang, Y. S., Y. Tu, S. A. Barker et F. Yang (2003), "Regulators of G-protein signaling (RGS) 4, insertion into model membranes and inhibition of activity by phosphatidic acid." The Journal of Biological Chemistry **278** (13), 11115-11122.

P

Panzner, S., L. Dreier, E. Hartmann, S. Kostka et T. A. Rapoport (1995), "Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p." Cell **81** (4), 561-570.

Pappan, K., S. Austin-Brown, K. D. Chapman et X. Wang (1998), "Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, -beta, and -gamma." Archives of Biochemistry and Biophysics **353** (1), 131-140.

Pappan, K., W. Qin, J. H. Dyer, L. Zheng et X. Wang (1997), "Molecular Cloning and Functional Analysis of Polyphosphoinositide-dependent Phospholipase D, PLD, from Arabidopsis." The Journal of Biological Chemistry **272** (11), 7055-7061.

Pappan, K. et X. Wang (1999), "Plant phospholipase Dalpha is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca(2+) concentrations." Archives of Biochemistry and Biophysics **368** (2), 347-353.

Parasassi, T., G. De Stasio, G. Ravagnan, R. M. Rusch et E. Gratton (1991), "Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence." Biophysical Journal **60** (1), 179-189.

Park, M. H., B. H. Ahn, Y. K. Hong et S. Min do (2009), "Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF-kappaB/Sp1-mediated signaling pathways." Carcinogenesis **30** (2), 356-365.

Paul, P., S. Simm, A. Blaumeiser, K. D. Scharf, S. Fragkostefanakis, O. Mirus et E. Schleiff (2013), "The protein translocation systems in plants - composition and variability on the example of *Solanum lycopersicum*." BMC Genomics **14**, 189.

Paulick, M. G. et C. R. Bertozzi (2008), "The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins." Biochemistry **47** (27), 6991-7000.

Pawelczyk, T. et A. Matecki (1999), "Phospholipase C-delta3 binds with high specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidic acid in bilayer membranes." European Journal of Biochemistry **262** (2), 291-298.

Pearce, D. A., N. Jotterand, I. S. Carrico et B. Imperiali (2001), "Derivatives of 8-Hydroxy-2-methylquinoline Are Powerful Prototypes for Zinc Sensors in Biological Systems." Journal of the American Chemical Society **123** (21), 5160-5161.

Peng, X. et M. A. Frohman (2012), "Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles." Acta Physiologica (Oxf) **204** (2), 219-226.

Perisic, O., S. Fong, D. E. Lynch, M. Bycroft et R. L. Williams (1998), "Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2." The Journal of Biological Chemistry **273** (3), 1596-1604.

Pinosa, F., N. Buhot, M. Kwaaitaal, P. Fahlberg, H. Thordal-Christensen, M. Ellerstrom et M. X. Andersson (2013), "Arabidopsis phospholipase ddelta is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi." Plant Physiology **163** (2), 896-906.

Pleskot, R., M. Potocky, P. Pejchar, J. Linek, R. Bezdova, J. Martinec, O. Valentova, Z. Novotna et V. Zarsky (2010), "Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton." The Plant Journal **62** (3), 494-507.

Pokalsky, C., P. Wick, E. Harms, F. E. Lytle et R. L. Van Etten (1995), "Fluorescence resolution of the intrinsic tryptophan residues of bovine protein tyrosyl phosphatase." The Journal of Biological Chemistry **270** (8), 3809-3815.

Ponting, C. P. et I. D. Kerr (1996), "A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues." Protein Science **5** (5), 914-922.

Q

Qin, C., M. Li, W. Qin, S. C. Bahn, C. Wang et X. Wang (2006), "Expression and characterization of Arabidopsis phospholipase Dgamma2." Biochimica et Biophysica Acta **1761** (12), 1450-1458.

Qin, C. et X. Wang (2002), "The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains." Plant Physiology **128** (3), 1057-1068.

Qin, W., K. Pappan et X. Wang (1997), "Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLDgamma and regulation of plant PLDgamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium." The Journal of Biological Chemistry **272** (45), 28267-28273.

R

Randall, R. W., R. W. Bonser, N. T. Thompson et L. G. Garland (1990), "A novel and sensitive assay for phospholipase D in intact cells." FEBS Letters **264** (1), 87-90.

Randazzo, P. A. (1997), "Resolution of two ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating proteins from rat liver." The Biochemical Journal **324 (Pt 2)**, 413-419.

Ravichandran, K. S. et U. Lorenz (2007), "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." Nature Reviews Immunology **7** (12), 964-974.

Rayon, C., P. Lerouge et L. Faye (1998), "The protein N-glycosylation in plants." Journal of Experimental Botany **49** (326), 1463-1472.

Roach, A. N., Z. Wang, P. Wu, F. Zhang, R. B. Chan, Y. Yonekubo, G. Di Paolo, A. A. Gorfe et G. Du (2012), "Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization." Journal of Lipid Research **53** (12), 2598-2609.

Rose, T. M. et G. D. Prestwich (2006), "Synthesis and evaluation of fluorogenic substrates for phospholipase D and phospholipase C." Organic Letters **8** (12), 2575-2578.

Rudge, S. A., C. Zhou et J. Engebrecht (2002), "Differential regulation of *Saccharomyces cerevisiae* phospholipase D in sporulation and Sec14-independent secretion." Genetics **160** (4), 1353-1361.

S

Saito, M., M. Iwadate, M. Higashimoto, K. Ono, Y. Takebayashi et S. Takenoshita (2007), "Expression of phospholipase D2 in human colorectal carcinoma." Oncology Reports **18** (5), 1329-1334.

Sang, Y., D. Cui et X. Wang (2001a), "Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in Arabidopsis." Plant Physiology **126** (4), 1449-1458.

Sang, Y., S. Zheng, W. Li, B. Huang et X. Wang (2001b), "Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α ." The Plant Journal **28** (2), 135-144.

Sato, H., T. Watanabe, Y. Sagane, Y. Nakazawa et K. Takano (2000), "Purification and Characterization of Phospholipase D from Cabbage Leaves." Food Science and Technology Research **6** (1), 29-33.

Schaeffer, A., R. Bronner, P. Benveniste et H. Schaller (2002), "The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1." The Plant Journal **25** (6), 605-615.

Schäffner, I., K.-P. Rücknagel, J. Mansfeld et R. Ulbrich-Hofmann (2002), "Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage." European Journal of Lipid Science and Technology **104** (2), 79-87.

Schöps, R., A. Schierhorn, I. Schäffner, J. Mansfeld et R. Ulbrich-Hofmann (2002), "Identification of Phospholipase D from Cabbage as N-Terminally Acetylated PLD2." Journal of Protein Chemistry **21** (6), 407-411.

Schroder, W. A., M. Buck, N. Cloonan, J. F. Hancock, A. Suhrbier, T. Sculley et G. Bushell (2007), "Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling." Cellular Signalling **19** (6), 1279-1289.

Scott, S. A., P. E. Selvy, J. R. Buck, H. P. Cho, T. L. Criswell, A. L. Thomas, M. D. Armstrong, C. L. Arteaga, C. W. Lindsley et H. A. Brown (2009), "Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness." Nature Chemical Biology **5** (2), 108-117.

Selvy, P. E., R. R. Lavieri, C. W. Lindsley et H. A. Brown (2011), "Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation." Chemical Reviews **111** (10), 6064-6119.

Sharom, F. J. (2011), "Flipping and flopping--lipids on the move." IUBMB Life **63** (9), 736-746.

Shen, C., R. Menon, D. Das, N. Bansal, N. Nahar, N. Guduru, S. Jaegle, J. Peckham et Y. K. Reshetnyak (2008), "The protein fluorescence and structural toolkit: Database and programs for the analysis of protein fluorescence and structural data." Proteins **71** (4), 1744-1754.

Shen, J., Y. Zeng, X. Zhuang, L. Sun, X. Yao, P. Pimpl et L. Jiang (2013), "Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system." Mol Plant **6** (5), 1419-1437.

Shigemura, K., J. L. Arbiser, S. Y. Sun, M. Zayzafoon, P. A. Johnstone, M. Fujisawa, A. Gotoh, B. Weksler, H. E. Zhou et L. W. Chung (2007), "Honokiol, a natural plant product, inhibits the bone metastatic growth of human prostate cancer cells." Cancer **109** (7), 1279-1289.

Shin, R., J. M. Jez, A. Basra, B. Zhang et D. P. Schachtman (2011), "14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism." FEBS Letters **585** (1), 143-147.

Shulga, Y. V., D. Loukov, P. T. Ivanova, S. B. Milne, D. S. Myers, G. M. Hatch, G. Umeh, D. Jalan, M. D. Fullerton, G. R. Steinberg, M. K. Topham, H. A. Brown et R. M. Epanand (2013), "Diacylglycerol kinase delta promotes lipogenesis." Biochemistry **52** (44), 7766-7776.

Shults, M. D. et B. Imperiali (2003), "Versatile fluorescence probes of protein kinase activity." Journal of the American Chemical Society **125** (47), 14248-14249.

Shynkar, V. V., A. S. Klymchenko, C. Kunzelmann, G. Duportail, C. D. Muller, A. P. Demchenko, J. M. Freyssinet et Y. Mely (2007), "Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis." Journal of the American Chemical Society **129** (7), 2187-2193.

Sigal, C. T., W. Zhou, C. A. Buser, S. McLaughlin et M. D. Resh (1994), "Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91** (25), 12253-12257.

Simoës, I., E. C. Mueller, A. Otto, D. Bur, A. Y. Cheung, C. Faro et E. Pires (2005), "Molecular analysis of the interaction between cardosin A and phospholipase D(alpha). Identification of RGD/KGE sequences as binding motifs for C2 domains." The FEBS Journal **272** (22), 5786-5798.

Singer, S. J. et G. L. Nicolson (1972), "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175** (4023), 720-731.

Singh, Y., A. Gulyani et S. Bhattacharya (2003), "A new ratiometric fluorescence probe as strong sensor of surface charge of lipid vesicles and micelles." FEBS Letters **541** (1-3), 132-136.

Stael, S., B. Wurzinger, A. Mair, N. Mehlmer, U. C. Vothknecht et M. Teige (2012), "Plant organellar calcium signalling: an emerging field." J Exp Bot **63** (4), 1525-1542.

Stahelin, R. V., B. Ananthanarayanan, N. R. Blatner, S. Singh, K. S. Bruzik, D. Murray et W. Cho (2004), "Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain." The Journal of Biological Chemistry **279** (52), 54918-54926.

Stahelin, R. V. et W. Cho (2001), "Roles of calcium ions in the membrane binding of C2 domains." The Biochemical Journal **359** (Pt 3), 679-685.

Stahelin, R. V., J. D. Rafter, S. Das et W. Cho (2003), "The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- α and group IVa cytosolic phospholipase A2." The Journal of Biological Chemistry **278** (14), 12452-12460.

Steed, P. M., K. L. Clark, W. C. Boyar et D. J. Lasala (1998), "Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants." FASEB Journal **12** (13), 1309-1317.

Stock, R. P., J. Brewer, K. Wagner, B. Ramos-Cerrillo, L. Duelund, K. D. Jernshoj, L. F. Olsen et L. A. Bagatolli (2012), "Sphingomyelinase D activity in model membranes: structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate." PLoS One **7** (4), e36003.

Strasser, R. (2016), "Plant protein glycosylation." Glycobiology **26** (9), 926-939.

Stuckey, J. A. et J. E. Dixon (1999), "Crystal structure of a phospholipase D family member." Nature structural biology **6** (3), 278-284.

Stumpe, S., S. Konig et R. Ulbrich-Hofmann (2007), "Insights into the structure of plant alpha-type phospholipase D." The FEBS Journal **274** (10), 2630-2640.

Sung, T. C., R. L. Roper, Y. Zhang, S. A. Rudge, R. Temel, S. M. Hammond, A. J. Morris, B. Moss, J. Engebrecht et M. A. Frohman (1997), "Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity." The EMBO Journal **16** (15), 4519-4530.

Sutton, R. B., B. A. Davletov, A. M. Berghuis, T. C. Sudhof et S. R. Sprang (1995), "Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold." Cell **80** (6), 929-938.

Sutton, R. B. et S. R. Sprang (1998), "Structure of the protein kinase C β phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca²⁺." Structure **6** (11), 1395-1405.

T

Takrama, J. F. et K. E. Taylor (1991), "A continuous spectrophotometric method for monitoring phospholipase D-catalyzed reactions of physiological substrates." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **23** (3), 217-226.

Tambourgi, D. V., V. L. Petricevich, F. C. Magnoli, S. L. Assaf, S. Jancar et W. Dias Da Silva (1998), "Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators." Toxicon **36** (2), 391-403.

Tao, H., W. Liu, B. N. Simmons, H. K. Harris, T. C. Cox et M. A. Massiah (2010), "Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS." Biotechniques **48** (1), 61-64.

Taylor, A. T. S. et P. S. Low (1997), "Phospholipase D Involvement in the Plant Oxidative Burst." Biochemical and Biophysical Research Communications **237** (1), 10-15.

Titov, D. V., B. Gilman, Q. L. He, S. Bhat, W. K. Low, Y. Dang, M. Smeaton, A. L. Demain, P. S. Miller, J. F. Kugel, J. A. Goodrich et J. O. Liu (2011), "XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide." Nature Chemical Biology **7** (3), 182-188.

Tiwari, K. et G. Paliyath (2011), "Cloning, expression and functional characterization of the C2 domain from tomato phospholipase Dalpha." Plant Physiology and Biochemistry **49** (1), 18-32.

Tokumura, A., E. Majima, Y. Kariya, K. Tominaga, K. Kogure, K. Yasuda et K. Fukuzawa (2002), "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase." The Journal of Biological Chemistry **277** (42), 39436-39442.

Tou, J.-s. et C. Urbizo (2001), "Resveratrol inhibits the formation of phosphatidic acid and diglyceride in chemotactic peptide- or phorbol ester-stimulated human neutrophils." Cellular Signalling **13** (3), 191-197.

Tou, J. S. et C. Urbizo (2008), "Diethylstilbestrol inhibits phospholipase D activity and degranulation by stimulated human neutrophils." Steroids **73** (2), 216-221.

Tsui, F. C., D. M. Ojcius et W. L. Hubbell (1986), "The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers." Biophysical Journal **49** (2), 459-468.

Tsumoto, K., M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima, J. S. Philo et T. Arakawa (2004), "Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification." Biotechnology Progress **20** (5), 1301-1308.

U-V

Ueki, J., S. Morioka, T. Komari et T. Kumashiro (1995), "Purification and characterization of phospholipase D (PLD) from rice (*Oryza sativa* L.) and cloning of cDNA for PLD from rice and maize (*Zea mays* L.)." Plant & Cell Physiology **36** (5), 903-914.

Valeur, B. (2001), Characteristics of Fluorescence Emission, in Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Molecular Fluorescence, Wiley-VCH Verlag GmbH, 34-71.

Verdaguer, N., S. Corbalan-Garcia, W. F. Ochoa, I. Fita et J. C. Gomez-Fernandez (1999), "Ca(2+) bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Calpha directly to phosphatidylserine." The EMBO Journal **18** (22), 6329-6338.

Verger, R. et G. H. De Haas (1973), "Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers." Chemistry and Physics of Lipids **10** (2), 127-136.

Verkleij, A. J., R. F. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn et L. L. van Deenen (1973), "The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy." Biochimica et Biophysica Acta **323** (2), 178-193.

Veverka, V., T. Crabbe, I. Bird, G. Lennie, F. W. Muskett, R. J. Taylor et M. D. Carr (2008), "Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR." Oncogene **27** (5), 585-595.

Vinggaard, A. M., T. Jensen, C. P. Morgan, S. Cockcroft et H. S. Hansen (1996), "Didecanoyl phosphatidylcholine is a superior substrate for assaying mammalian phospholipase D." The Biochemical Journal **319** (Pt 3), 861-864.

Vivian, J. T. et P. R. Callis (2001), "Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins." Biophysical Journal **80** (5), 2093-2109.

W

Wagner, K. et G. Brezesinski (2007), "Phospholipase D activity is regulated by product segregation and the structure formation of phosphatidic acid within model membranes." Biophysical Journal **93** (7), 2373-2383.

Wang, C. et X. Wang (2001), "A novel phospholipase D of Arabidopsis that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane." Plant Physiology **127** (3), 1102-1112.

Wang, C., C. A. Zien, M. Afitlhile, R. Welti, D. F. Hildebrand et X. Wang (2000), "Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis." The Plant Cell **12** (11), 2237-2246.

Wang, X. (2000), "Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions." Progress in Lipid Research **39**, 109-149.

Wang, X., J. H. Dyer et L. Zheng (1993), "Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm." Archives of Biochemistry and Biophysics **306** (2), 486-494.

Wang, X., L. Xu et L. Zheng (1994), "Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L." The Journal of Biological Chemistry **269** (32), 20312-20317.

Watanabe, T., S. Chuma, Y. Yamamoto, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Totoki, A. Toyoda, Y. Hoki, A. Fujiyama, T. Shibata, T. Sado, T. Noce, T. Nakano, N. Nakatsuji, H. Lin et H. Sasaki (2011), "MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline." Developmental Cell **20** (3), 364-375.

Watanabe, T., H. Sato, Y. Sagane, Y. Nakazawa et K. Takano (1999), "Primary structure of phospholipase D purified from cabbage leaves." Seibutsu Butsuri Kagaku **43** (3), 159-164.

Welti, R., W. Li, M. Li, Y. Sang, H. Biesiada, H. E. Zhou, C. B. Rajashekar, T. D. Williams et X. Wang (2002), "Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis." The Journal of Biological Chemistry **277** (35), 31994-32002.

Westerheide, S. D., T. L. Kawahara, K. Orton et R. I. Morimoto (2006), "Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death." The Journal of Biological Chemistry **281** (14), 9616-9622.

Wilhelmy, L. (1863), "Ueber die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers." Annalen der Physik, 119, 177.

Williamson, P., E. M. Bevers, E. F. Smeets, P. Comfurius, R. A. Schlegel et R. F. A. Zwaal (1995), "Continuous Analysis of the Mechanism of Activated Transbilayer Lipid Movement in Platelets." Biochemistry **34** (33), 10448-10455.

Winkler, F. K., A. D'Arcy et W. Hunziker (1990), "Structure of human pancreatic lipase." Nature **343** (6260), 771-774.

X

Xiang, L., E. Etxeberria et W. Van den Ende (2013), "Vacuolar protein sorting mechanisms in plants." The FEBS journal **280** (4), 979-993.

Xie, Z., W. T. Ho et J. H. Exton (1998), "Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity." The Journal of Biological Chemistry **273** (52), 34679-34682.

Xie, Z., W. T. Ho et J. H. Exton (2000), "Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D. Contribution of the conserved HKD motifs to the interaction and the requirement of the association for Ser/Thr phosphorylation of the enzyme." The Journal of Biological Chemistry **275** (32), 24962-24969.

Xu, L., A. Q. Paulsen, S. B. Ryu et X. Wang (1996), "Intracellular Localization of Phospholipase D in Leaves and Seedling Tissues of Castor Bean." Plant Physiology **111** (1), 101-107.

Xu, Y., L. F. Seet, B. Hanson et W. Hong (2001), "The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling." The Biochemical Journal **360** (Pt 3), 513-530.

Y

Yamamoto, H., K. Hanada, K. Kawasaki et M. Nishijima (1997), "Inhibitory effect of curcumin on mammalian phospholipase D activity." FEBS Letters **417** (2), 196-198.

Yamaoka, S., Y. Shimono, M. Shirakawa, Y. Fukao, T. Kawase, N. Hatsugai, K. Tamura, T. Shimada et I. Hara-Nishimura (2013), "Identification and dynamics of Arabidopsis adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development." The Plant Cell **25** (8), 2958-2969.

Yamaryo, Y., E. Dubots, C. Albrieux, B. Baldan et M. A. Block (2008), "Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLDzeta2, an Arabidopsis thaliana phospholipase D." FEBS Letters **582** (5), 685-690.

Yang, J., R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson et Y. Zhang (2015), "The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction." Nature Methods **12** (1), 7-8.

Yang, S. F., S. Freer et A. A. Benson (1967), "Transphosphatidylolation by phospholipase D." The Journal of Biological Chemistry **242** (3), 477-484.

Yuan, H., L. Chen, G. Paliyath, A. Sullivan, D. P. Murr et Z. Novotna (2006), "Immunohistochemical localization of phospholipase D in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) fruits." Scientia Horticulturae **109** (1), 35-42.

Z

Zambonelli, C., M. Casali et M. F. Roberts (2003), "Mutagenesis of putative catalytic and regulatory residues of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D differentially modifies phosphatase and phosphodiesterase activities." The Journal of Biological Chemistry **278** (52), 52282-52289.

Zemla, A., C. Venclovas, K. Fidelis et B. Rost (1999), "A modified definition of *Sov*, a segment-based measure for protein secondary structure prediction assessment." Proteins **34** (2), 220-223.

Zhang, W., C. Qin, J. Zhao et X. Wang (2004), "Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101** (25), 9508-9513.

Zhang, W., C. Wang, C. Qin, T. Wood, G. Olafsdottir, R. Welti et X. Wang (2003), "The oleate-stimulated phospholipase D, PLDdelta, and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in Arabidopsis." The Plant Cell **15** (10), 2285-2295.

Zhao, C., G. Du, K. Skowronek, M. A. Frohman et D. Bar-Sagi (2007), "Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos." Nature Cell Biology **9** (6), 706-712.

Zhao, J., S. P. Devaiah, C. Wang, M. Li, R. Welti et X. Wang (2013), "Arabidopsis phospholipase Dbeta1 modulates defense responses to bacterial and fungal pathogens." The New phytologist **199** (1), 228-240.

Zhao, J., C. Wang, M. Bedair, R. Welti, L. W. Sumner, I. Baxter et X. Wang (2011), "Suppression of phospholipase Dgamma confers increased aluminum resistance in Arabidopsis thaliana." PLoS One **6** (12), e28086.

Zhao, J. et X. Wang (2004), "Arabidopsis phospholipase Dalpha1 interacts with the heterotrimeric G-protein alpha-subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors." The Journal of Biological Chemistry **279** (3), 1794-1800.

Zhao, Y., H. Ehara, Y. Akao, M. Shamoto, Y. Nakagawa, Y. Banno, T. Deguchi, N. Ohishi, K. Yagi et Y. Nozawa (2000), "Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer." Biochemical and Biophysical Research Communications **278** (1), 140-143.

Zheng, L., R. Krishnamoorthi, M. Zolkiewski et X. Wang (2000), "Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase dalpha and beta." The Journal of Biological Chemistry **275** (26), 19700-19706.

Zheng, L., J. Shan, R. Krishnamoorthi et X. Wang (2002), "Activation of plant phospholipase Dbeta by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: characterization of binding site and mode of action." Biochemistry **41** (14), 4546-4553.

Zhou, M., C. Zhang et R. P. Haugland (2000), Choline oxidase: a useful tool for high-throughput assays of acetylcholinesterase, phospholipase D, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, and sphingomyelinase. Advances in Nucleic Acid and Protein Analyses, Manipulation, and Sequencing, Limbach, P. A., Owicki, J. C., Raghavachari, R., Tan, W. **3926**, 166-171.

Article 1

Rahier R, Noiriel A, Abousalham A. Development of a Direct and Continuous Phospholipase D Assay Based on the Chelation-Enhanced Fluorescence Property of 8-Hydroxyquinoline. *Anal. Chem.*, 2016, 88 (1), pp 666–674.
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02332

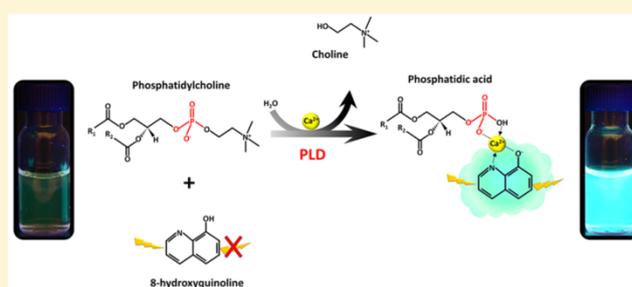
Development of a Direct and Continuous Phospholipase D Assay Based on the Chelation-Enhanced Fluorescence Property of 8-Hydroxyquinoline

Renaud Rahier, Alexandre Noiriél, and Abdelkarim Abousalham*

Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) UMR 5246 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques, Bâtiment Raulin, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Through its production of phosphatidic acid (PA), phospholipase D (PLD) is strongly involved in vesicular trafficking and cell signaling, making this enzyme an important therapeutic target. However, most PLD assays developed so far are either discontinuous or based on the indirect determination of choline released during PLD-catalyzed phosphatidylcholine hydrolysis, making its kinetic characterization difficult. We present here the development of a direct, specific, and continuous PLD assay that is based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline (8HQ) following Ca^{2+} complexation with PLD-generated PA. The real-time fluorescence intensity from 8HQ/ Ca^{2+} /PA complexes can be converted to concentrations of product using a calibration curve, with a detection limit of 1.2 μM of PA on a microplate scale, thus allowing measurement of the PLD-catalyzed reaction rate parameters. Hence, this assay is well adapted for studying the substrate specificity of PLD, together with its kinetic parameters, using natural phospholipids with various headgroups. In addition, the assay was found to be effective in monitoring the competitive inhibition of PA formation in the production of phosphatidylalcohols following the addition of primary alcohols, such as ethanol, propan-1-ol, or butan-1-ol. Finally, this assay was validated using the purified recombinant *Vigna unguiculata* PLD, as well as the PLD from *Streptomyces chromofuscus*, cabbage, or peanuts, and no PA production could be detected using phospholipase A_1 , phospholipase A_2 , or phospholipase C, allowing for a reliable determination of PLD activity in crude protein extract samples. This easy to handle PLD assay constitutes, to our knowledge, the first direct and continuous PA determination method on a microplate scale.



Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4) belongs to a lipolytic enzyme subclass which hydrolyzes the terminal phosphodiester bond of glycerophospholipids, leading to the formation of phosphatidic acid (PA) and a freepolar headgroup. In addition, this enzyme is able to catalyze the transphosphatidyl reaction which, in the presence of a primary alcohol, leads to the formation of the corresponding phosphatidylalcohol.¹ Over recent decades, PLD has gradually emerged as one of the key components of a broad range of cellular and physiological processes (see ref 2 for a review). PLD was first discovered in plants,³ where it plays a central role in seed germination,^{4,5} growth and biomass accumulation,⁶ stress,^{7,8} defense,⁹ and wound healing.¹⁰ Subsequently, it has been described in a wide range of organisms, including mammals, bacteria, yeasts, and viruses (see ref 2 for a review). In mammals, PLD has been linked with various pathological disorders, such as several cancers,^{11,12} thrombotic¹³ and neurodegenerative diseases.¹⁴ PLD-generated PA is an essential lipid mediator that exhibits unique features, compared to the other phospholipids. Due to its negative charge and its tiny headgroup, PA presents a cone shaped structure that induces a negative spontaneous curvature of the lipid bilayer,

facilitating the events of fission and fusion of membranes.¹⁵ In addition, PA recruits and regulates numerous membrane-associated proteins, including the mammalian target of rapamycin (mTOR)¹⁶ and the serine/threonine kinase Raf-1,¹⁷ promoting cell growth, proliferation, and survival. Thus, through its production of PA, PLD is strongly involved in vesicular trafficking and cell signaling, making this enzyme an important therapeutic target.

Numerous methods have been reported for determining the enzymatic activity of PLD, which can be routinely assayed by single-point determination. So far, radiolabeled phospholipids have been the most extensively used substrates for PLD (see ref 18 for a review). This method employs radiolabeled acyl chains,¹⁹ phosphorus,¹ or the headgroup²⁰ of the phospholipid, making it versatile and appropriate for both cellular and acellular uses. However, despite their high sensitivity, radioactivity-based assays tend to be laborious, discontinuous, and not suitable for

Received: June 21, 2015

Accepted: December 4, 2015

Published: December 4, 2015

high-throughput studies. Meanwhile, several attempts to develop simple and accurate methods for measuring PLD activity have been reported. These efforts have yielded numerous assays, based on Langmuir monolayers,²¹ conductimetry,^{22,23} infrared spectroscopy,²⁴ electrophoretic-electroosmotic focusing,²⁵ or ratiometric upconversion fluorescence sensing,²⁶ offering attractive alternatives to radioactivity but remaining difficult to handle routinely. Consequently, the development of enzyme-coupled assays has gradually emerged as a suitable alternative for routine use. These tests are based on the quantification of choline released during the PLD-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine (PC). In these assays, the released choline is measured, throughout the activity of choline oxidase and peroxidase, by the formation of a colored²⁷ or fluorescent²⁸ complex. Alternatively, synthetic phospholipids, such as phosphatidyl-*p*-nitrophenol²⁹ or fluorescein-labeled phospholipids,³⁰ constitute valuable tools for the rapid screening of PLD activities, bypassing the requirement of coupled enzymes. In addition, all these described methods can be performed using microplates, making them convenient and easy to handle, although they present a major drawback in that they are based on the use of synthetic substrates and they are restricted to phospholipids with choline as the headgroup. Other spectrophotometric methods for monitoring PLD activity have been developed on the basis of the determination of PA either via iron(III) complexation³¹ or by quantifying the inorganic phosphate released from PA by the action of alkaline phosphatase, which forms a blue complex in the presence of molybdenum.³²

8-Hydroxyquinoline (8HQ) is a hydrophobic bidentate chelating agent which becomes fluorescent upon metal complexation.³³ In the absence of metal ions, 8HQ may undergo a photoinduced tautomerization, which corresponds to an intramolecular proton transfer from the phenol to the pyridine ring nitrogen, resulting in a nonradiative relaxation.³⁴ Conversely, metal chelation by 8HQ induces a deprotonation of the phenol, promoting strong fluorescence.³⁵ This property of 8HQ and its derivatives, known as a chelation-enhanced fluorescence phenomenon, has been widely used to detect traces of metal ions using aqueous micellar media,^{33,36,37} synthetic chemosensors,^{38–40} peptide scaffolds,⁴¹ and probes for live-cell imaging.^{42,43} On the basis of this property, Shults and Imperiali⁴⁴ have been able to develop a modular peptide scaffold which harbors a derivative of 8HQ and a kinase recognition motif in front of one another. This peptidic chemosensor becomes strongly fluorescent upon phosphorylation, allowing the monitoring of kinase activities and suggesting that 8HQ is a suitable probe for detecting phosphate containing molecules, such as PLD-generated PA.

In addition, numerous fluorescent molecules, such as xanthene-based chromophores,⁴⁵ have been synthesized and characterized so far, leading to the development of powerful biological sensors, such as Ca²⁺-based reporters of protein kinase activity.⁴⁶ These fluorescent molecules represent versatile and promising tools for the development of PA detection assays.

We present here the development and applications of a novel fluorescent PLD assay, based on the direct and continuous determination of PA by 8HQ in the presence of Ca²⁺. In this assay, Ca²⁺ appears to be crucial since it is required not only for PLD activity but also for the fluorescent detection of PA by 8HQ. Thus, the Ca²⁺-dependent hydrolysis of phospholipids by PLD leads to the formation of PA which subsequently binds to Ca²⁺, eventually generating a fluorescent 8HQ/Ca²⁺/PA complex. This is, to our knowledge, the first report of a continuous PA

determination method on a microplate scale. This assay is well adapted for an investigation of the substrate specificity of PLD, together with its kinetic interfacial mechanisms, using natural phospholipids with various headgroups. It can also be used for monitoring prokaryotic and eukaryotic PLD activities, even in crude protein extract samples, as well as for the screening of PLD inhibitors.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Materials. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (POPG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-serine (POPS), and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (POPA) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA). Soybean phosphatidylethanol (PEth) was purchased from Larodan AB (Malmö, Sweden). Phosphatidylbutanol (PBut) was obtained from Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York, USA). 8-Hydroxyquinoline (>99%) was purchased from Merck. 8-Hydroxy-5-quinolinesulfonic acid hydrate, Triton X-100, sodium taurodeoxycholate (NaTDC), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), cetylpyridinium chloride (CPC), choline oxidase (from *Arthrobacter globiformis*), and horseradish peroxidase (type VI) were obtained from Sigma-Aldrich-Fluka Chimie (St-Quentin-Fallavier, France). Sodium dodecyl sulfate (SDS) and Zymolyase 20T were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Flat-bottom black 96-well microplates (Greiner bio-one) were obtained from Dominique Dutscher (Brumath, France), and thin layer chromatography (TLC) Xtra SIL G/UV₂₅₄ plates were purchased from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Germany).

Proteins. Recombinant *Vigna unguiculata* PLD (VuPLD) used in this study was produced in the yeast *Pichia pastoris* X-33 and purified as previously described.⁴⁷ Cabbage (*Brassica oleracea*) PLD (BoPLD), *Streptomyces chromofuscus* PLD (ScPLD), peanut (*Arachis hypogaea*) PLD (AhPLD), *Clostridium perfringens* phospholipase C (PLC), *Thermomyces lanuginosus* phospholipase A₁ (PLA₁), and porcine pancreatic phospholipase A₂ (PLA₂) were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chimie (St-Quentin-Fallavier, France). All enzyme concentrations were determined using the Bradford's procedure,⁴⁸ with Bio-Rad Dye Reagent and bovine serum albumin as the standard.

Preparation of 8HQ/Phospholipid/Detergent Mixtures. To prepare the mixtures, 40 nmol of phospholipids (266 μM, final concentration) were first dissolved in chloroform and then evaporated under a stream of nitrogen. Subsequently, dried phospholipids were dispersed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM Triton X-100, 0.7 mM SDS, 66 μM 8HQ, 50 μM EDTA, and 20 mM CaCl₂. Finally, the micellar solution was vortexed for 30 s, sonicated for 10 min using a bath sonicator (Deltasonic type O11C, Fécamp, France), and vortexed again for 30 s. Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed using these standard assay conditions with POPC or POPA detergent mixed micelles in a 1 mL cuvette on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom).

Choline Oxidase/Peroxidase Coupled PLD Assay. Choline generated from the hydrolysis of POPC by PLD was quantified, as previously described,⁴⁷ with some modifications. The substrate solution (100 μL per well) was prepared by dispersing 266 μM of POPC in a mixture containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM CaCl₂, 0.7 mM SDS, and 1 mM Triton X-

100. The mixed micelle solution was vortexed for 30 s, sonicated for 10 min using a bath sonicator (Deltasonic type O11C, Fécamp, France), and vortexed again for 30 s. The reaction was initiated by adding PLD and incubated, for 5 min, at 30 °C. Finally, the PLD reaction was stopped and choline was quantified, at the same time, by adding 50 μL of a solution containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM EDTA, 5.1 mM 4-aminoantipyrine, 27 mM sodium 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzenesulfonate, 0.1 U choline oxidase, and 0.5 U peroxidase. After a 30 min stabilization period, the absorbance at 500 nm was recorded and the amounts of free choline were quantified, on the basis of a standard curve obtained with pure choline. Control assays were performed simultaneously in the absence of PLD. One unit of PLD activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of choline per minute under the experimental conditions specified above.

Specific Binding of 8HQ to PA in the Presence of Ca^{2+} .

All fluorescence experiments were recorded at 30 °C using a Tecan Infinite M200 (Salzburg, Austria) microplate fluorescence reader. A fluorescence emission spectrum of 8HQ was acquired, in the presence or absence of 20 mM Ca^{2+} , with phospholipid/detergent mixed micelles containing either POPC or POPA (266 μM), in a final volume of 150 μL . Spectra were recorded between 400 and 650 nm after excitation at 366 nm, using bandwidths of 10 nm for excitation and 20 nm for emission. For time-dependent detection of PA experiments, 8HQ mixtures containing variable amounts of POPC/POPA were prepared, as previously described (see above), without Ca^{2+} , giving a final volume of 140 μL . Subsequently, the fluorescence emission intensity at 490 nm (λ_{ex} 366 nm) was recorded as a function of time using bandwidths of 9 nm for excitation and 20 nm for emission. Finally, after 120 s of incubation, 10 μL of Ca^{2+} (20 mM, final concentration) was injected to give a final volume of 150 μL .

A calibration curve was obtained by incubating 8HQ with mixtures containing variable amounts of POPC/POPA in the presence of 20 mM Ca^{2+} (150 μL , final volume). Each value was obtained by increasing the proportions of PA and decreasing the proportions of PC accordingly to maintain a constant final concentration of phospholipids (266 μM). Fluorescence emission intensities were recorded at 490 nm (λ_{ex} 366 nm) using bandwidths of 9 nm for excitation and 20 nm for emission. The data obtained were processed by fitting to the following hyperbolic equation (eq 1):

$$I_f = \frac{a[\text{PA}]}{b + [\text{PA}]} + I_{f_0} \quad (1)$$

where I_f and I_{f_0} are the fluorescence intensities obtained, respectively, in the presence or absence of PA, a and b are constants, and $[\text{PA}]$ represents the PA concentration added. The sensitivity (S) and the limit of detection (LOD) were calculated according to the definition of $S = a/b$ and $\text{LOD} = \text{mean}(I_{f_0}) + 3 \times \text{SD}_{I_{f_0}}$ where SD is the standard deviation.

8HQ-PLD-Based Assay. Typical assays were carried out in a final volume of 150 μL . To monitor the rates of PA formation by PLD, substrate micelles containing the desired phospholipids (266 μM , final concentration) were prepared as described above (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM Triton X-100, 0.7 mM SDS, 66 μM 8HQ, 50 μM EDTA, and 20 mM CaCl_2). Fluorescence emission intensities at 490 nm were recorded as a function of time (λ_{ex} 366 nm), using bandwidths of 9 nm for excitation and 20 nm for emission. The background fluorescence I_{f_0} (see eq 1)

was recorded for 120 s; PLD was subsequently injected to give the desired final concentration (4–800 ng/well), and the fluorescence signal intensity was recorded, at intervals of 30 s, for 30 min. For each kinetic recording, PA quantities were determined using eq 2:

$$[\text{PA}] = \frac{b(I_f - I_{f_0})}{a - (I_f - I_{f_0})} \quad (2)$$

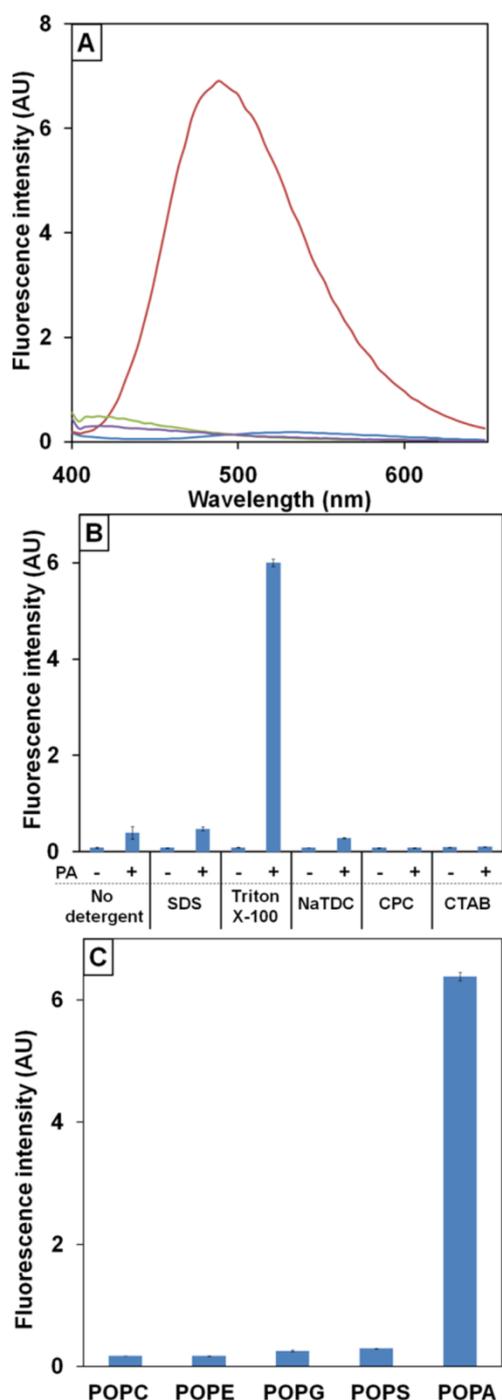
The amounts of PA were determined from the linear part of the curve ($R^2 > 0.97$), which corresponds to the steady state of the reaction rates. One unit of PLD activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of PA per minute under these experimental conditions.

To monitor PLD activities in crude extracts, cells from an overnight culture of the yeast *Pichia pastoris* X-33, transformed either by the pGAPZB vector alone or by the vector containing the full-length cDNA of VuPLD, were harvested by centrifugation at 5000g. Subsequently, cells were resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 200 mM sucrose, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zymolyase. After a 1 h incubation at 30 °C, cells were lysed using a mini-beadbeater (Biospec); insoluble material from the crude extract was pelleted by centrifugation at 10 000g, and the soluble fraction was tested for PLD activity. Specific activities were determined as previously described (see above) by injecting 500 ng of protein/well, using POPC as the substrate.

PLD Transphosphatidyltransferase Reaction and TLC Analysis. The reaction mixtures were prepared, as described above, by mixing 266 μM of POPC dispersed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM Triton X-100, 0.7 mM SDS, 66 μM 8HQ, 50 μM EDTA, 20 mM CaCl_2 , and 260 mM of ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, or butan-2-ol. The reaction was started by adding the purified recombinant VuPLD (100 ng/well), and the fluorescence was recorded for 30 min at intervals of 30 s, as described above. The phospholipids were then extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v) under vigorous shaking. Phase separation was facilitated by centrifugation for 5 min at 200g. The lower organic phase was collected and subjected to TLC separation, together with PA and phosphatidylalcohol standards, as previously described.⁴⁷ TLC plates were developed in a solvent system using a mixture of chloroform/methanol/water (65:25:4, v/v/v) as the eluent. Phospholipid spots were revealed by charring the plate after spraying it with a mixture of 10% copper sulfate and 10% phosphoric acid in water. Silica plate pictures were finally acquired using a Gel Doc system (Bio-Rad).

RESULTS AND DISCUSSION

Development of the Method. On the basis of the ability of 8HQ to bind phosphate groups in the presence of metal ions,⁴⁴ we decided to investigate its behavior in the presence of PA and Ca^{2+} in order to develop a direct and continuous PLD-generated PA monitoring method on a microplate scale. Figure 1A (red curve) shows a typical fluorescence emission spectrum of the 8HQ/ Ca^{2+} /PA complex dispersed in standard buffer at pH 8. This fluorescence emission spectrum was found to be maximal at an emission wavelength of 490 nm when excited at 366 nm (Figure 1A, red curve), while no 8HQ fluorescence occurred with POPC in either the presence (Figure 1A blue curve) or absence of 20 mM of Ca^{2+} (Figure 1A, purple curve). This behavior demonstrates the high selectivity of the Ca^{2+} -dependent binding of 8HQ to PA, since no such signal could be seen in the absence of Ca^{2+} (Figure 1A, green curve). Interestingly, the 8HQ/ Ca^{2+} /



1. Specific binding of 8HQ to PA in the presence of Ca^{2+} . (A) Fluorescence emission spectra of 8HQ (λ_{ex} 366 nm) with mixed SDS/X-100 micelles containing either POPC (0.26 mM) in the absence (purple curve) or in the presence (blue curve) of 20 mM of Ca^{2+} . Fluorescence intensity was recorded in arbitrary units (AU), and bandwidths were set at 10 nm for excitation and 20 nm for emission. (B) Fluorescence emission intensity of 8HQ in the absence or presence of 0.26 mM of POPA with various ionic detergents (1 mM final concentration) and 20 mM of Ca^{2+} . (C) Fluorescence emission intensity of 8HQ in the presence of 20 mM Ca^{2+} and mixed SDS/Triton X-100 micelles containing 0.26 mM PC, POPE, POPG, POPS, or POPA. For B and C, bandwidths were set at 9 nm for excitation and 20 nm for emission (AU: Arbitrary

units). PA complex presented two maximum fluorescence excitation wavelengths at 270 and 366 nm, both leading to a maximum fluorescence emission at 490 nm. However, subsequent experiments were carried out by exciting at 366 nm, in order to avoid any intrinsic protein fluorescence interferences. Moreover, 8HQ concentration was fixed at 66 μM in order to keep the absorbance below 0.05 and to provide reliable measurements, by avoiding any inner filter effects.⁴⁹ In addition, although the fluorescence signal reached a plateau at 0.5 mM of Ca^{2+} (Figure S1), all subsequent experiments were carried out at 20 mM of Ca^{2+} which corresponds to the concentration required for optimal plant PLD activity *in vitro*.⁵⁰ Likewise, since PLDs have been shown to require mixed detergent/phospholipid micelles to be fully active,^{50,51} we have evaluated the binding of 8HQ to POPA in the presence of charged and neutral detergents, compared to POPA vesicles without detergent (Figure 1B). Although no striking difference was observed following the addition of 1 mM of SDS or 1 mM of NaTDC, compared to POPA vesicles in the absence of detergent, the presence of 1 mM of the positively charged detergents CPC or CTAB completely abolished the fluorescence signal of 8HQ (Figure 1B). We concluded that positive charges may interact with phosphate groups, preventing 8HQ from binding to PA. Conversely, the presence of 1 mM of the neutral detergent Triton X-100 (Figure 1B) led to a large increase in the fluorescence intensity, corresponding to about 40-times the background, suggesting a positive effect on the 8HQ quantum yield. To investigate this effect further, the fluorescence intensity of the 8HQ/ Ca^{2+} /PA complex was plotted against Triton X-100 concentrations (Figure S2) and was found to increase from 0 to 1 mM, reaching a plateau at higher Triton X-100 concentrations. To investigate further the impact of chemical substitutions on the fluorescence intensity of 8HQ, we subsequently examined the fluorescence of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid under the same experimental conditions. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid is a widely used 8HQ derivative which harbors an electron-withdrawing sulfonic acid moiety, leading to an increased quantum yield. However, 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid showed a weaker fluorescence enhancement in the presence of Ca^{2+} and PA/SDS/Triton X-100 mixed micelles (Figure S3), compared to 8HQ, presumably due to a different orientation in the mixed micelles. Taken together, these results indicate that PA detection by 8HQ can be performed in the presence of anionic and neutral detergents, especially SDS and Triton X-100, which are critical for optimal PLD activity. Indeed, using sunflower (*Helianthus annuus*) PLD,⁵¹ we have previously demonstrated that the addition of either Triton X-100 or SDS induced a 10-fold increase in PLD activity, while the association of both detergents led to a 30-fold increase. On the basis of these data, further kinetic experiments were carried out in the presence of 1 mM Triton X-100 and 0.7 mM SDS. Under these standard assay conditions, DLS analysis revealed the presence of particles with an average hydrodynamic diameter of 8.56 (± 2.05) nm for POPC containing mixed micelles and 8.05 (± 2.07) nm for POPA containing mixed micelles. These values are in good agreement with the previously published data⁵² and suggest that phospholipids are fully solubilized in detergent micelles. In addition, both mixtures presented a monodisperse size distribution, ensuring homogeneous measurements.

Subsequently, in order to investigate the ability of 8HQ to discriminate between PLD substrates and product, the selective detection of PA compared to other phospholipids was examined. As shown in Figure 1C, 8HQ fluorescence emission intensity at

490 nm was recorded in the presence of POPC, POPE, POPG, POPS, or POPA, using the previously described experimental conditions. As expected, the 8HQ fluorescence intensity signal, in the presence of POPA mixtures, was found to be around 40-times higher than the one obtained in the presence of zwitterionic phospholipids, such as POPC or POPE. Interestingly, 8HQ/Ca²⁺/POPA fluorescence was also found to be about 30-times higher than the one with the negatively charged phospholipids POPG or POPS, indicating that the presence of a monoesterified phosphate group is critical for an efficient 8HQ/Ca²⁺ chelation-enhanced fluorescence phenomenon. Taken together, these results strongly suggest that 8HQ can detect PA in a direct and specific manner and it is suitable for monitoring the PLD substrate specificity.

In order to evaluate the potential use of 8HQ as a real-time sensor of PLD activities, we further investigated its behavior in the presence of mixtures containing variable amounts of PC/PA (Figure 2A). For this, 8HQ was incubated with mixed micelles containing increasing proportions of POPA in line with decreasing proportions of POPC, thus keeping the final phospholipids concentration constant. As shown in Figure 2A,

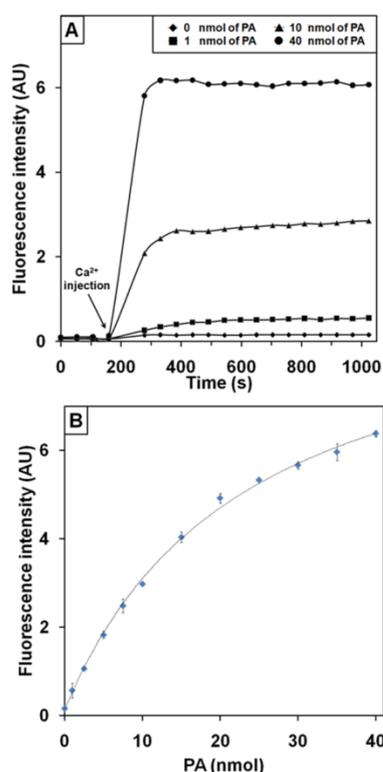


Figure 2. (A) Time-dependent detection of PA by 8HQ fluorescence. 8HQ was incubated with PC/SDS/Triton X-100 mixed micelles containing variable amounts of PA, and the fluorescence emission at 490 nm was recorded (λ_{ex} 366 nm). After 120 s (arrow), Ca²⁺ was injected to give a 20 mM final concentration. (B) Calibration curve for the quantification of PA using 8HQ fluorescence at 490 nm (λ_{ex} 366 nm) and fitted (dashed curve) using a nonlinear regression. 8HQ was incubated with SDS/Triton X-100 mixtures containing variable amounts of POPC/POPA at pH 8, in the presence of 20 mM Ca²⁺. Each value was obtained by increasing the proportions of POPA in line with decreasing the proportions of POPC to maintain a constant final concentration of phospholipids (0.26 mM, final concentration). Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments (AU: Arbitrary Units).

the fluorescence signal was found to increase concomitantly with added PA, with a detection time lower than 60 s after Ca²⁺ injection. Moreover, this fluorescence signal increase was best fitted to a hyperbolic equation (see Experimental Section), as previously described,³¹ allowing us to generate a calibration curve for the quantification of POPA in the presence POPC (Figure 2B). The same results were obtained using POPA alone (Figure S4A) or POPA in the presence of POPE (Figure S4B), POPG (Figure S4C), or POPS (Figure S4D). Therefore, under these experimental conditions, the detection limit, on a microtiter plate scale, was found to be 1.2 μ M of PA (0.18 nmol), which corresponds to 0.45% of the total phospholipids added, together with a sensitivity level of 0.42 ± 0.02 AU·nmol⁻¹. As a comparison, using an iron(III) complexation PLD assay,³¹ the detection limit has been reported as 10.2 μ M of PA on a microplate scale.

Finally, since 8HQ has been shown to act as a ribonucleic acid synthesis inhibitor,⁵³ we subsequently investigated the 8HQ potential inhibitory effect toward PLD enzymatic activity. To do so, the hydrolysis of POPC was further performed using pure recombinant VuPLD in the presence of increasing amounts of 8HQ, ranging from 0 to 530 μ M (Figure S5). For each condition, free choline was quantified using the enzyme-coupled choline oxidase/peroxidase assay described in the Experimental Section. Regardless of the 8HQ concentration, VuPLD showed a specific activity of around 10 U·mg⁻¹, indicating that 8HQ does not behave as a PLD inhibitor.

Kinetic Recordings of the PLD-Catalyzed Formation of PA. Taking advantage of the selective and continuous detection of PA by 8HQ in the presence of Ca²⁺, we investigated further the fluorescence intensity behavior during the time course hydrolysis of POPC by VuPLD (Figure 3A, red curve). After the addition of 1 pmol (0.1 μ g/well) of the purified recombinant VuPLD, an increase in the fluorescence intensity measured at 490 nm was observed, composed of a slow accelerating phase for around 1–2 min (lag time) followed by a second phase corresponding to the steady state of the reaction (Figure 3A, red curve). The amount of PA was then calculated from the fluorescence intensity measured at 490 nm using eq 2, deduced from the calibration curve (see Experimental Section). It is worth noting that no PA could be detected by injecting heat-inactivated VuPLD (Figure 3A, blue curve), thus confirming that the fluorescence signal increase was due to the enzymatic activity and not to artifacts. The lag time observed may reflect several phenomena, such as a nonconfident detection of PA at low concentrations and also a rate-limiting step due to the slow penetration of PLD into the water/lipid interface⁵⁴ or an interfacial activation of PLD by its own product.^{55–57} Indeed, Kuppe et al.⁵⁵ and Madj et al.⁵⁶ have previously demonstrated that the cabbage PLD-catalyzed formation of PA facilitates the binding of PLD to the membrane, and this leads to an increase in its hydrolytic activity. Moreover, PA is a cone-shaped phospholipid that can induce curvature of lipid membranes contributing to the modulation of PLD binding and activity.⁵⁶ Consequently, all kinetic values were measured at the steady-state of the reaction. Using POPC as the substrate, the steady-state reaction rate (nmol PA·min⁻¹) was shown to increase linearly with the amount of enzyme, within the range of 0.04 to 2.5 pmol (4–240 ng) (Figure 3B). The specific activity of VuPLD was shown to be 9.8 (\pm 0.6) U·mg⁻¹, using POPC as the substrate under standard assay conditions. For the sake of comparison, the specific activity of VuPLD was shown to be around 10 U·mg⁻¹, using the choline/peroxidase coupled assay (see Figure S5) and POPC as the substrate under standard assay

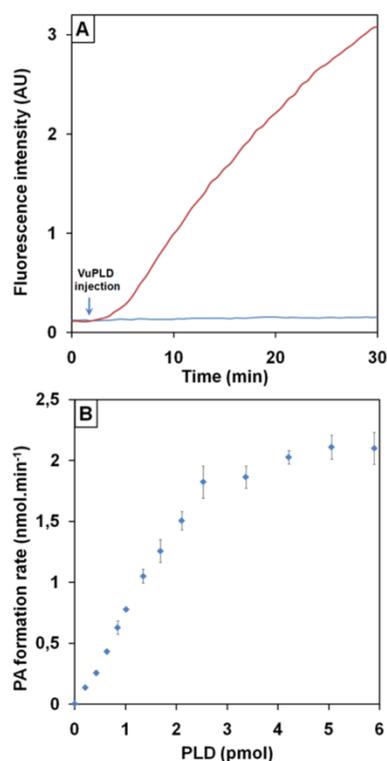


Figure 3. Monitoring PA formation by the purified recombinant VuPLD. (A) Typical kinetic curve of POPA formation using SDS/Triton X-100 mixtures containing POPC (0.26 mM) as the substrate and following an injection (arrow) of 1 pmol (0.1 μg) of VuPLD (red curve) or of heat-inactivated VuPLD (blue curve). POPA amounts were determined using the calibration curve presented in Figure 2B. (B) POPA formation rates as a function of increasing amounts of VuPLD, using SDS/Triton X-100 mixtures containing POPC (0.26 mM) as the substrate. The rates of POPA formation were determined from the steady state part of the kinetic curves, as described in the Experimental Section. Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments (AU: Arbitrary Units).

conditions. In addition, the main advantage of the present assay is the determination of PLD hydrolytic activity using various phospholipids with different headgroups, allowing for a characterization of the substrate specificity of PLD. Thus, the specific activity of VuPLD was found to be 5.5 ± 0.4 and $0.7 \pm 0.08 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, using POPE and POPG as the respective substrates while, under the same experimental conditions, no VuPLD activity could be detected using POPS as the substrate. These results were confirmed by TLC analysis of the reaction products (Figure S6). To date, very little data have been available for the study of PLD substrate specificity. Nevertheless, Pappan et al. and Moreno-Pérez et al. demonstrated, using a radioactivity-based PLD assay, that recombinant *Ricinus communis* PLD,⁵⁸ as well as recombinant *Helianthus annuus* PLD,⁵⁹ were able to hydrolyze PC, PE, and PG. Likewise, Dippe and Ulbrich-Hofmann³¹ used a spectrophotometric PA determination method, via iron(III) complexation, for assaying cabbage (*Brassica oleracea*) PLD2 activity on various phospholipid substrates. With soybean phospholipids, the authors reported that PC was rapidly converted to PA ($82.2 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) while PG was hydrolyzed much more slowly ($27.2 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) and PE was poorly hydrolyzed ($3.1 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$). These authors have also reported the use of a biphasic aqueous/diethyl ether reaction system for assaying cabbage PLD1 and PLD2, as well as opium poppy PLD1 and PLD2, toward PC, PE, PG, PS, and PI.⁶⁰ Using high performance-TLC, these enzymes were found to hydrolyze, in order of preference, $\text{PC} > \text{PG} = \text{PE} > \text{PI} > \text{PS}$ for cabbage PLD1, $\text{PE} > \text{PG} = \text{PC} > \text{PI} > \text{PS}$ for cabbage PLD2, $\text{PE} > \text{PC} > \text{PG} > \text{PI}$ for poppy PLD1, and $\text{PE} \gg \text{PG} > \text{PC} > \text{PS} > \text{PI}$ for poppy PLD2.⁶⁰ For comparison, we have previously studied the substrate specificity of PLD from germinating sunflower (*Helianthus annuus*) seeds and cultured-soybean (*Glycine max*) cells,⁶¹ using their transphosphatidylation capacities in the presence of [¹⁴C]-ethanol. We observed that sunflower and soybean PLD showed the following order of specificity: $\text{PC} > \text{PE} > \text{PG}$ while PS was utilized much less efficiently.⁶¹ These results were found to be in accordance with the following decreasing order of specificity: $\text{POPC} > \text{POPE} > \text{POPG}$ found in the present study.

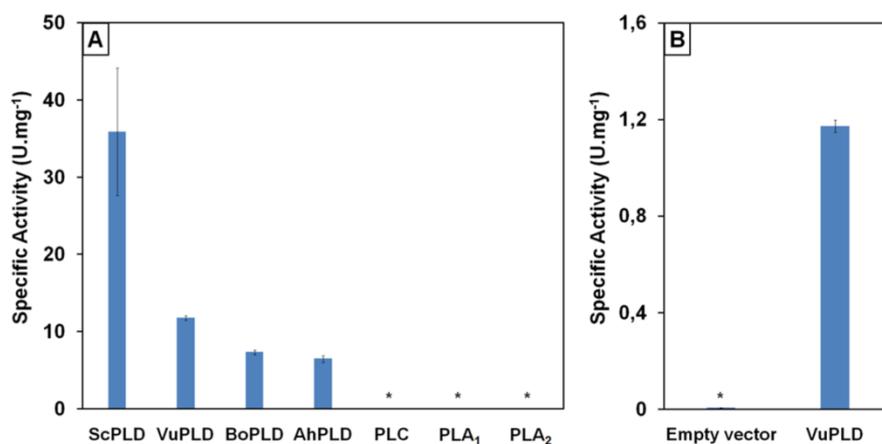


Figure 4. Specificity of the PLD-catalyzed formation of PA using SDS/Triton X-100 mixtures containing POPC (0.26 mM) as the substrate. (A) Specific activity of ScPLD, VuPLD, BoPLD, and AhPLD. The specific activities of *Clostridium perfringens* PLC, *Thermomyces lanuginosus* PLA₁, and porcine pancreatic PLA₂ were below the detection limit (*). (B) Specific activity of a *Pichia pastoris* crude extract expressing either recombinant VuPLD or transformed with the empty vector (control) and using SDS/Triton X-100 mixtures containing POPC (0.26 mM) as the substrate. The rates of PA formation were determined from the steady state part of the kinetic curves, as described in the Experimental Section. Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments. * indicates that the activity was below the detection limit, estimated as 3 times the background level. One unit of PLD activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of PA/min under the experimental conditions.

We further validated the use of this assay by employing several commercial PLDs from plant and bacterial origin. As shown in Figure 4A, using POPC as the substrate, specific activities were found to be 35.8 ± 8.2 , 7.3 ± 0.3 , and 6.5 ± 0.4 U·mg⁻¹ for ScPLD, BoPLD, and AhPLD, respectively. These enzymes showed similar kinetic behaviors, as observed for VuPLD (Figure S7). Conversely, no PA formation could be observed under these conditions using *Thermomyces lanuginosus* PLA₁, porcine pancreatic PLA₂, or *Clostridium perfringens* PLC, demonstrating the high selectivity of this assay for the PLD hydrolysis reaction and, thereby, strongly supporting its suitable application for use with crude cellular extracts. As a proof of concept, we subsequently validated this assay by determining the PLD activity contained in a crude protein extract sample from *Pichia pastoris* expressing either recombinant VuPLD or transformed with the corresponding empty vector as a control. As shown in Figure 4B, cell lysate containing VuPLD exhibits a specific activity of 1.17 ± 0.03 U·mg⁻¹ while, under these conditions, no PLD activity could be detected for the control. According to these results, this assay appears to be well adapted for the screening of PLD activities directly in crude protein extract samples, on a microplate scale.

Inhibition of PA Production by PLD-Mediated Phosphatidylalcohol Synthesis. Since PLD is able to catalyze transphosphatidylation reactions in the presence of primary alcohols, we further evaluated the ability of this assay to monitor the competitive inhibition of PA formation in the production of phosphatidylalcohols. Thus, as shown in Figure 5A, the addition of primary alcohols, such as ethanol, propan-1-ol, and butan-1-ol, inhibited PA formation by 36%, 37%, and 56%, respectively. Conversely, the addition of secondary alcohols, such as propan-2-ol and butan-2-ol, were shown to inhibit PA formation by only 13% and 28%, respectively (Figure 5A). We subsequently confirmed these results by TLC analysis of the corresponding lipolysis products (Figure 5B), compared to controls (Figure 5C). The qualitative decrease of PA spots, together with the appearance of phosphatidylethanol, phosphatidylpropan-1-ol, and phosphatidylbutan-1-ol, can be clearly identified in Figure 5B (lanes 2, 3, and 5, respectively), thus confirming that primary alcohols act as appropriate nucleophilic phosphatidyl acceptors. In contrast, neither a significant decrease of the PA spots nor the appearance of phosphatidylalcohol spots was observed when using propan-2-ol or butan-2-ol as the acceptor (Figure 5B, lanes 4 and 6, respectively). These results corroborate previous results obtained by Ella et al. demonstrating that secondary alcohols cannot access the binding pocket of PLD and, thus, cannot undergo transphosphatidylation reactions.⁶⁰ However, while no transphosphatidylation reactions occur in the presence of this kind of alcohol, we could, nevertheless, see a perceptible decrease in PLD hydrolytic activities (Figure 5A), suggesting a slight inhibitory effect of this alcohols at the concentration used. Finally, as a proof of concept, the quantitative inhibition of PA production by PLD-mediated phosphatidylethanol synthesis was investigated. As expected, PA formation rates were found to decrease when increasing ethanol concentrations, from 0 to 3 M. Therefore, using POPC as the substrate, a concentration of 773 (± 58) mM of ethanol was found to reduce PA formation by 50%, under the standard assay conditions, indicating that this assay is suitable for the screening of new PLD inhibitors.

CONCLUSIONS

The key feature of the assay developed here is that the fluorescence signal of 8HQ is considerably increased in the

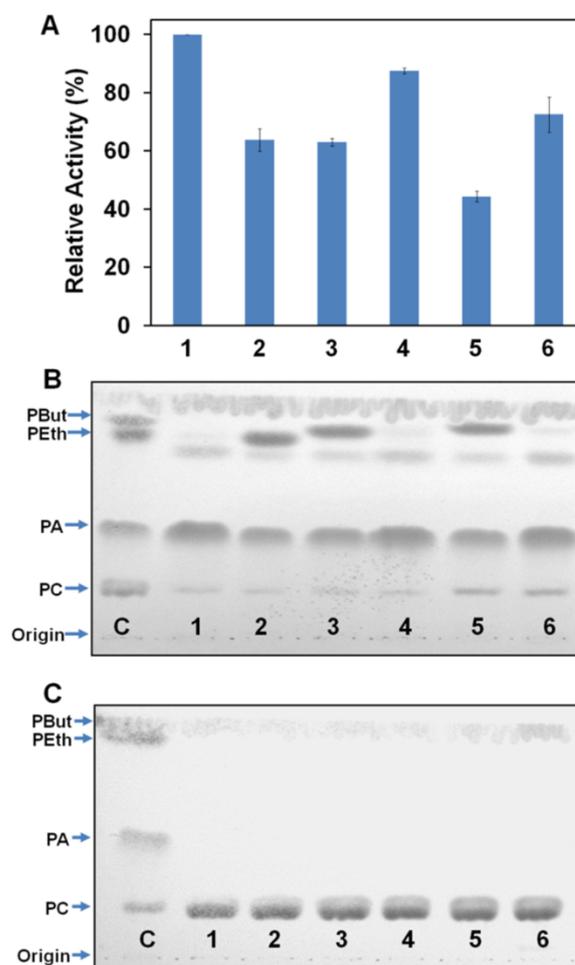


Figure 5. Effects of alcohols on the VuPLD-catalyzed formation of PA. (A) Relative PA formation rate (%) as a function of various alcohols, using SDS/Triton X-100 mixtures containing POPC (0.26 mM) as the substrate. VuPLD was assayed by measuring PA formation, as described in the Experimental Section, and relative rates, expressed as percentages, were calculated from PA formed in the absence of alcohols taken as being 100%. Each assay was carried out with 1 pmol (0.1 μ g) of the purified recombinant VuPLD in the absence (1) or presence of 260 mM of ethanol (2), propan-1-ol (3), propan-2-ol (4), butan-1-ol (5), or butan-2-ol (6). Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments. (B) and (C) TLC analysis of the VuPLD-catalyzed transphosphatidylation reaction products obtained from (A) after 30 min reaction time (B) or immediately after starting the reaction (C). Lipids were extracted, developed, and revealed as described in the Experimental Section. Lane C: phospholipid controls: arrows point to POPC, POPA, phosphatidylethanol (PEth), phosphatidylbutanol (PBut), and the origin of application; lane 1: without any alcohol added; lane 2: plus ethanol; lane 3: plus propan-1-ol; lane 4: plus propan-2-ol; lane 5: plus butan-1-ol; lane 6: plus butan-2-ol.

presence of PA/Ca²⁺ complexes. Taking advantage of this property, we have developed an easy to handle method which allows for the specific and continuous monitoring of PLD activities on a microplate scale. This use of quantitative and qualitative kinetics to follow PLD-generated PA is suitable for routine applications and opens new perspectives for further experiments, such as the investigation of the PA mediated PLD activation phenomenon.^{55–57} Therefore, our novel PLD assay will serve, in the future, to give an insight into the regulation mechanisms of PLD, such as the potential role of an allosteric

activation, using not only PC but also PE, PG, and PS as the substrate. In addition, owing to its high specificity, this assay will also be useful for detecting new PLD activity-containing organisms, from prokaryotic or eukaryotic origins, directly using crude lysate samples and to screen PLD inhibitors as well. Finally, this work demonstrates the broad potential application of fluorescent probes in the development of novel sensitive assays.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02332.

Details on the development of the method and kinetic recording of the PLD-catalyzed formation of PA. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: abousalham@univ-lyon1.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The French Ministry of Science and Education is gratefully acknowledged for the funding of R.R. The authors would like to thank Professor Loïc Blum and the GEMBAS team (ICBMS, France) for kindly allowing us to use the Tecan Infinite M200. Dr. Bastien Doumèche is also acknowledged for his helpful discussions, as well as Yani Arhab for his help in VuPLD purification work. The authors would also like to thank the FENNEC team members (Institut Lumière Matière, France) for dynamic light scattering experiments and especially Mahmoud Ould Metidji and Marie Plissonneau for their help. English revision by Valerie James is also acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Yang, S. F.; Freer, S.; Benson, A. A. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 477–484.
- (2) Selvy, P. E.; Lavieri, R. R.; Lindsley, C. W.; Brown, H. A. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6064–6119.
- (3) Hanahan, D. J.; Chaikoff, I. L. *J. Biol. Chem.* **1947**, *168*, 233–240.
- (4) Dyer, J. H.; Ryu, S. B.; Wang, X. *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 715–724.
- (5) Ryu, S. B.; Zheng, L.; Wang, X. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1171–1176.
- (6) Hong, Y.; Devaiah, S. P.; Bahn, S. C.; Thamasandra, B. N.; Li, M.; Welti, R.; Wang, X. *Plant J.* **2009**, *58*, 376–387.
- (7) Frank, W.; Munnik, T.; Kerkmann, K.; Salamini, F.; Bartels, D. *Plant Cell* **2000**, *12*, 111–124.
- (8) Sang, Y.; Cui, D.; Wang, X. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 1449–1458.
- (9) Pinosa, F.; Buhot, N.; Kwaaitaal, M.; Fahlberg, P.; Thordal-Christensen, H.; Ellerstrom, M.; Andersson, M. X. *Plant Physiol.* **2013**, *163*, 896–906.
- (10) Ryu, S. B.; Wang, X. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1996**, *1303*, 243–250.
- (11) Noh, D. Y.; Ahn, S. J.; Lee, R. A.; Park, I. A.; Kim, J. H.; Suh, P. G.; Ryu, S. H.; Lee, K. H.; Han, J. S. *Cancer Lett.* **2000**, *161*, 207–214.
- (12) Zhao, Y.; Ehara, H.; Akao, Y.; Shamoto, M.; Nakagawa, Y.; Banno, Y.; Deguchi, T.; Ohishi, N.; Yagi, K.; Nozawa, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *278*, 140–143.
- (13) Elvers, M.; Stegner, D.; Hagedorn, I.; Kleinschnitz, C.; Braun, A.; Kuijpers, M. E.; Boesl, M.; Chen, Q.; Heemskerck, J. W.; Stoll, G.; Frohman, M. A.; Nieswandt, B. *Sci. Signaling* **2010**, *3*, ra1.
- (14) Kanfer, J. N.; Singh, I. N.; Pettegrew, J. W.; McCartney, D. G.; Sorrentino, G. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **1996**, *14*, 361–363.
- (15) Kooijman, E. E.; Chupin, V.; Fuller, N. L.; Kozlov, M. M.; de Kruijff, B.; Burger, K. N.; Rand, P. R. *Biochemistry* **2005**, *44*, 2097–2102.
- (16) Fang, Y.; Vilella-Bach, M.; Bachmann, R.; Flanigan, A.; Chen, J. *Science* **2001**, *294*, 1942–1945.
- (17) Rizzo, M. A.; Shome, K.; Watkins, S. C.; Romero, G. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23911–23918.
- (18) Morris, A. J.; Frohman, M. A.; Engebrecht, J. *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 1–9.
- (19) Bailey, L. J.; Choudhary, V.; Merai, P.; Bollag, W. B. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1195*, 111–131.
- (20) Brown, H. A.; Gutowski, S.; Moomaw, C. R.; Slaughter, C.; Sternweis, P. C. *Cell* **1993**, *75*, 1137–1144.
- (21) Abousalham, A.; Ivanova, M. G.; Douchet, I.; Verger, R. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *79*, 107–112.
- (22) Mezna, M.; Lawrence, A. J. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 370–376.
- (23) Majd, S.; Yusko, E. C.; MacBriar, A. D.; Yang, J.; Mayer, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16119–16126.
- (24) Do, I. D.; Buchet, R.; Pikula, S.; Abousalham, A.; Mebarek, S. *Anal. Biochem.* **2012**, *430*, 32–38.
- (25) Liu, C.; Huang, D.; Yang, T.; Cremer, P. S. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1753–1759.
- (26) Cen, Y.; Wu, Y. M.; Kong, X. J.; Wu, S.; Yu, R. Q.; Chu, X. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7119–7127.
- (27) Takrama, J. F.; Taylor, K. E. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1991**, *23*, 217–226.
- (28) Zhou, M.; Zhang, C.; Haugland, R. P. In *Advances in Nucleic Acid and Protein Analyses, Manipulation, and Sequencing*; Limbach, P. A., Owicki, J. C., Raghavachari, R., Tan, W.; Proc. SPIE: Bellingham, WA, 2000; pp 166–171.
- (29) D'Arrigo, P.; Piergianni, V.; Scarcelli, D.; Servi, S. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 249–254.
- (30) Liu, S. J.; Wen, Q.; Tang, L. J.; Jiang, J. H. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5944–5950.
- (31) Dippe, M.; Ulbrich-Hofmann, R. *Anal. Biochem.* **2009**, *392*, 169–173.
- (32) Martin, S. F.; DeBlanc, R. L.; Hergenrother, P. J. *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 106–110.
- (33) Prat, M. D.; Compano, R.; Beltran, J. L.; Codony, R. *J. Fluoresc.* **1994**, *4*, 279–281.
- (34) Bardez, E.; Devol, I.; Larrey, B.; Valeur, B. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7786–7793.
- (35) Bronson, R. T.; Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Lamb, R. D.; Dalley, N. K.; Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Savage, P. B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11139–11144.
- (36) Soroka, K.; Vithanage, R. S.; Phillips, D. A.; Walker, B.; Dasgupta, P. K. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 629–636.
- (37) Sanz-Medel, A.; de la Campa, R. F.; Alonso, J. I. G. *Analyst* **1987**, *112*, 493.
- (38) Zhang, X. X.; Bradshaw, J. S.; Bordunov, A. V.; Izatt, R. M. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1997**, *29*, 259–268.
- (39) Zhang, H.; Han, L. F.; Zachariasse, K. A.; Jiang, Y. B. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4217–4220.
- (40) Prodi, L.; Bargossi, C.; Montalti, M.; Zaccheroni, N.; Su, N.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; Savage, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6769–6770.
- (41) Shults, M. D.; Pearce, D. A.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10591–10597.
- (42) Maruyama, S.; Kikuchi, K.; Hirano, T.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10650–10651.
- (43) Pearce, D. A.; Jotterand, N.; Carrico, I. S.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5160–5161.
- (44) Shults, M. D.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14248–14249.
- (45) Minta, A.; Kao, J. P.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8171–8178.
- (46) Chen, C. A.; Yeh, R. H.; Lawrence, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3840–3841.

- (47) Ben Ali, Y.; Carriere, F.; Abousalham, A. *Protein Expression Purif.* **2007**, *51*, 162–169.
- (48) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (49) Valeur, B. In *Molecular Fluorescence*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2001; pp 34–71.
- (50) Abdelkafi, S.; Abousalham, A. *Plant Physiol. Biochem.* **2011**, *49*, 752–757.
- (51) Abousalham, A.; Nari, J.; Teissere, M.; Ferte, N.; Noat, G.; Verger, R. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248*, 374–379.
- (52) Lopez, O.; de la Maza, A.; Coderch, L.; Lopez-Iglesias, C.; Wehrli, E.; Parra, J. L. *FEBS Lett.* **1998**, *426*, 314–318.
- (53) Fraser, R. S.; Creanor, J. *Biochem. J.* **1975**, *147*, 401–410.
- (54) Wieloch, T.; Borgstrom, B.; Pieroni, G.; Pattus, F.; Verger, R. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 11523–11528.
- (55) Kuppe, K.; Kerth, A.; Blume, A.; Ulbrich-Hofmann, R. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2853–2859.
- (56) Majd, S.; Yusko, E. C.; Yang, J.; Sept, D.; Mayer, M. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 146–153.
- (57) Geng, D.; Chura, J.; Roberts, M. F. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12195–12202.
- (58) Pappan, K.; Austin-Brown, S.; Chapman, K. D.; Wang, X. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *353*, 131–140.
- (59) Moreno-Perez, A. J.; Martinez-Force, E.; Garces, R.; Salas, J. J. *Plant Physiol.* **2010**, *167*, 503–511.
- (60) Ella, K. M.; Meier, K. E.; Kumar, A.; Zhang, Y.; Meier, G. P. *IUBMB Life* **1997**, *41*, 715–724.
- (61) Abdelkafi, S.; Abousalham, A. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*, 196.

Supporting Information

Development of a direct and continuous phospholipase D assay based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline

Renaud Rahier, Alexandre Noiriél and Abdelkarim Abousalham

Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) UMR 5246 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques, Bâtiment Raulin, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

TABLE OF CONTENTS

Figure S1. Fluorescence emission intensity of 8HQ as function of Ca ²⁺ concentration.	S-2
Figure S2. Fluorescence emission intensity of 8HQ as function of Triton X-100 concentration.	S-2
Figure S3. Fluorescence emission intensity of 8HQ5S as function of Ca ²⁺ concentration.	S-3
Figure S4. Calibration curve for the quantification of PA.	S-4
Figure S5. Specific activity of the purified recombinant VuPLD as function of 8HQ concentration.	S-5
Figure S6. TLC analysis of the VuPLD-catalyzed hydrolysis of POPC, POPE, POPG and POPS.	S-6
Figure S7. Monitoring of POPA formed by the action of ScPLD, BoPLD and AhPLD.	S-6

Development of the method

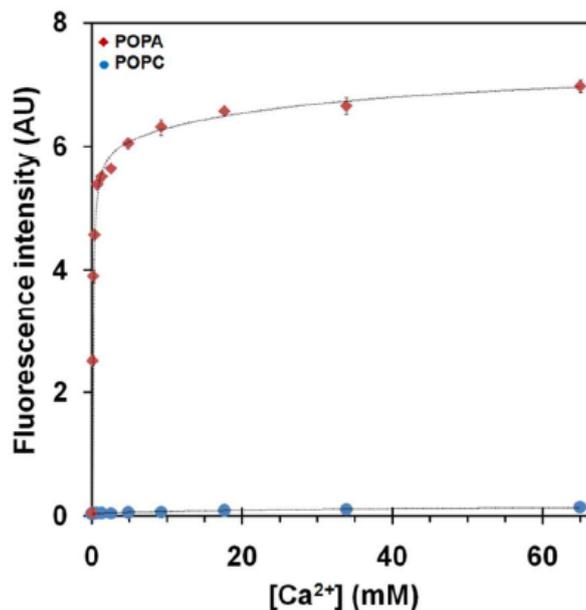


Figure S1. Fluorescence emission intensity of 8HQ as function of increasing amounts of Ca²⁺ and in the presence of mixed SDS/Triton X-100 micelles containing 0.26 mM of either POPC (●) or POPA (◆). Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments and fitted (dashed curves) using a non-linear regression. Bandwidths were set at 9 nm for excitation and 20 nm for emission. (AU: Arbitrary Units).

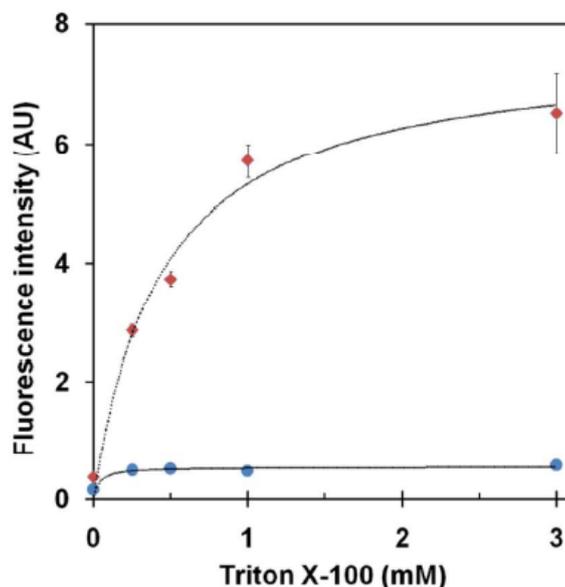


Figure S2. Fluorescence emission intensity of 8HQ in the presence of 0.26 mM of either POPC (●) or POPA (◆) as function of increasing amounts of Triton X-100. Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments and fitted (dashed curves) using a non-linear regression. Bandwidths were set at 9 nm for excitation and 20 nm for emission. (AU: Arbitrary Units).

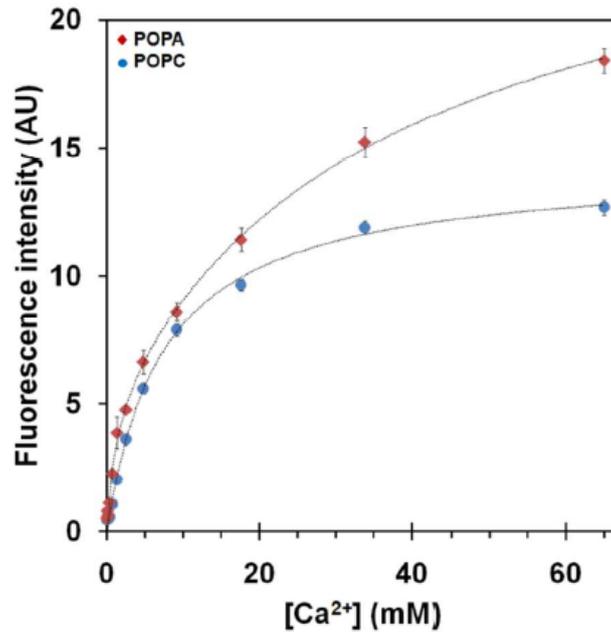


Figure S3. Fluorescence emission intensity of 8HQ5S as function of increasing amounts of Ca^{2+} and in the presence of mixed SDS/Triton X-100 micelles containing 0.26 mM of either POPC (●) or POPA (◆). Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments and fitted (dashed curves) using a non-linear regression. Bandwidths were set at 9 nm for excitation and 20 nm for emission. (AU: Arbitrary Units).

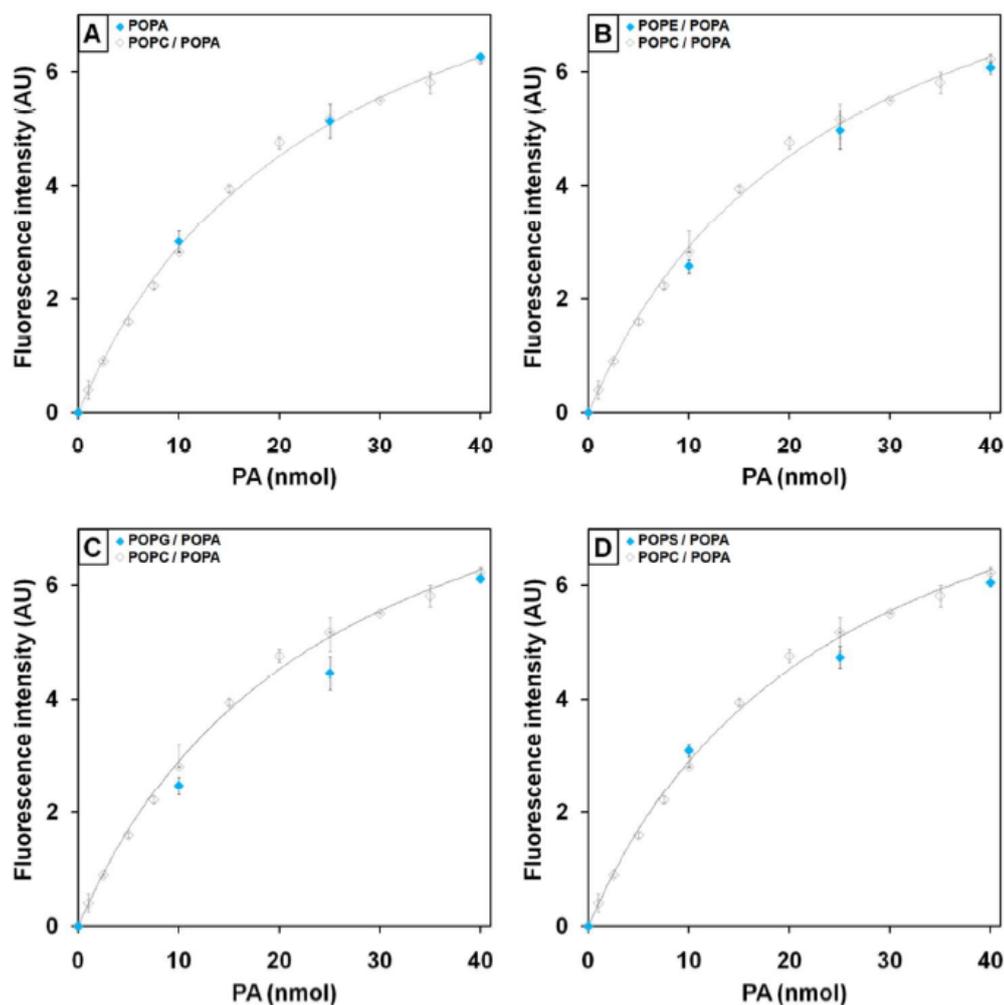


Figure S4. Calibration curve for the quantification of PA using 8HQ fluorescence at 490 nm (λ_{ex} 366 nm). 8HQ was incubated with SDS/Triton X-100 mixtures containing variable amounts of (A) POPA, (B) POPE/POPA, (C) POPG/POPA and (D) POPS/POPA at pH 8, in the presence of 20 mM Ca^{2+} . Values were compared with the calibration curve obtained with POPC/POPA mixtures and fitted (dashed curve) using a non-linear regression. Except for POPA, each value was obtained by increasing the proportions of POPA in line with decreasing the proportions of the selected phospholipid to maintain a constant final concentration of phospholipids (0.26 mM, final concentration). Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments. Bandwidths were set at 9 nm for excitation and 20 nm for emission. (AU: Arbitrary Units).

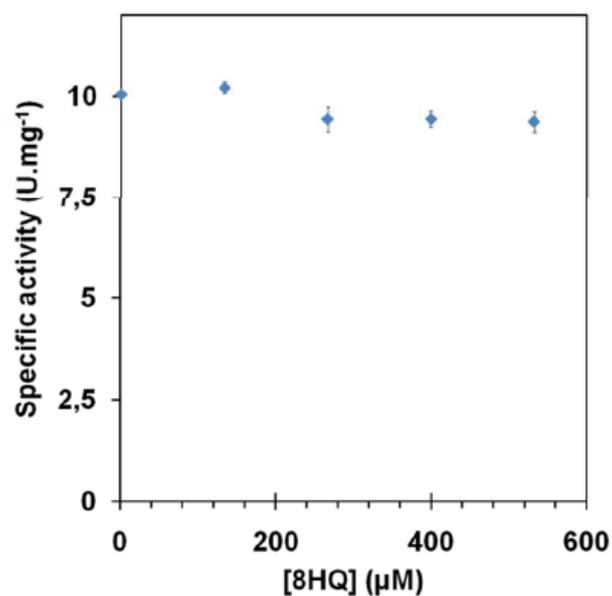


Figure S5. Specific activity of the purified recombinant VuPLD toward mixed SDS/Triton X-100 micelles containing POPC (0.26 mM, final concentration) as the substrate and in the presence of increasing amount of 8HQ. Free choline was quantified using the enzyme-coupled choline oxidase / peroxidase assay described in the Experimental section. One unit of PLD activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of choline per minute under the experimental conditions. Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments.

Kinetic recordings of the PLD-catalyzed formation of PA.

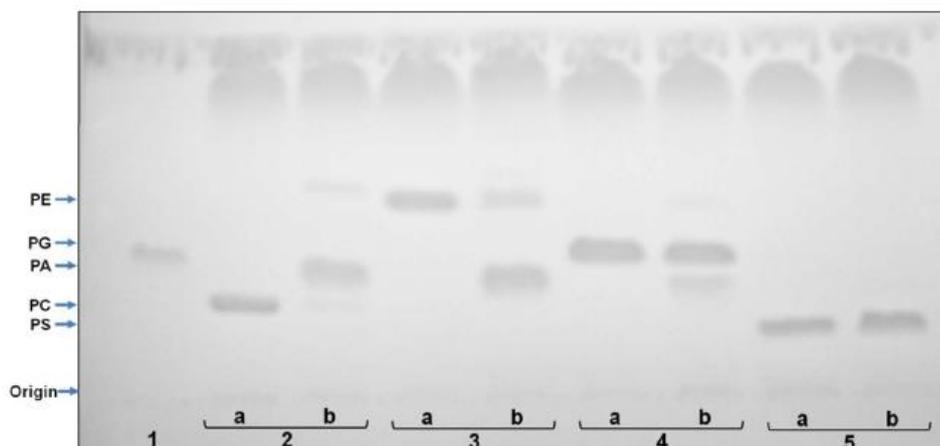


Figure S6. TLC analysis of the VuPLD-catalyzed hydrolysis of mixed SDS/Triton X-100 micelles containing 0.26 mM of POPC, POPE, POPG or POPS. Lipids were extracted either immediately after (a) starting the reaction or after 30 min (b) of reaction, developed as described in the Experimental section and revealed using iodine vapor. Arrows point to POPA, POPC, POPE, POPG, POPS and origin of application. Lane 1: POPA, lane 2: POPC, lane 3: POPE, lane 4: POPG, lane 5: POPS.

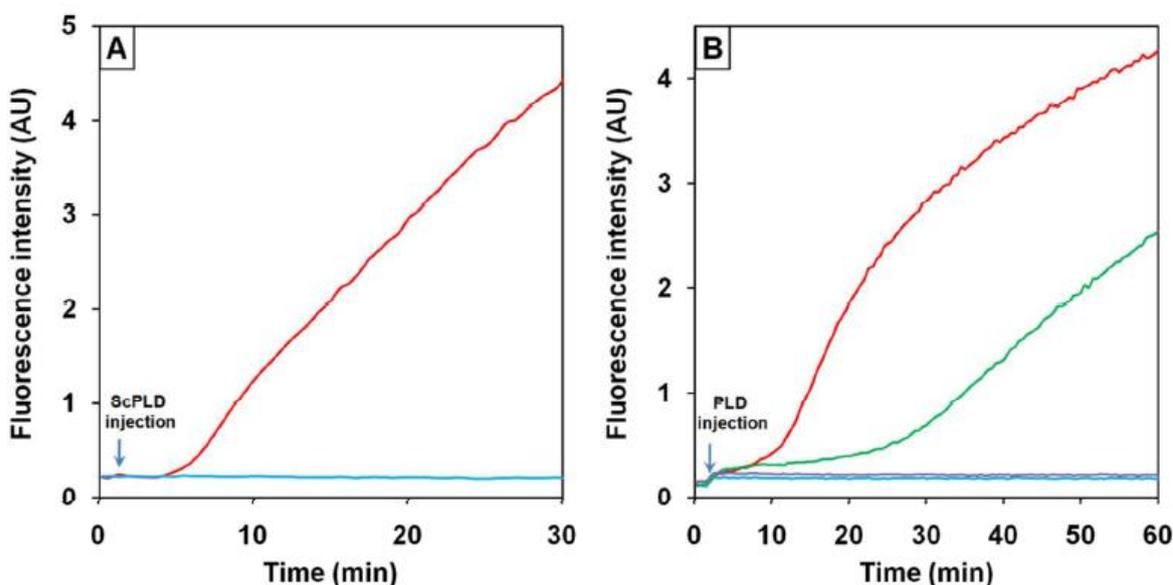


Figure S7. Kinetic recording of POPA formation using 8HQ fluorescence at 490 nm (λ_{ex} 366 nm) and mixed SDS/Triton X-100 micelles containing POPC (0.26 mM, final concentration) as the substrate. (A) Kinetic recording of POPA formation after an injection (arrow) of 0.15 μ g of ScPLD (red curve) or buffer alone (blue curve). (B) Kinetic recording of POPA formation after an injection (arrow) of 0.06 μ g of BoPLD (red curve) or heat-inactivated BoPLD (blue curve) and 0.04 μ g of AhPLD (green curve) or heat-inactivated AhPLD (purple curve).

Article 2

Rahier R, Noiriel A, Abousalham A. Functional Characterization of the N-Terminal C2 Domain from *Arabidopsis thaliana* Phospholipase D α and D β .
BioMed Research International, 2016, pp 1-15
DOI: 10.1155/2016/2721719

Research Article

Functional Characterization of the N-Terminal C2 Domain from *Arabidopsis thaliana* Phospholipase D α and D β

Renaud Rahier, Alexandre Noiriel, and Abdelkarim Abousalham

Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS), Univ Lyon, Université Lyon 1, UMR 5246 CNRS, Métabolisme, Enzymes et Mécanismes Moléculaires (MEM²), F-69622 Villeurbanne cedex, France

Correspondence should be addressed to Abdelkarim Abousalham; abousalham@univ-lyon1.fr

Received 13 July 2016; Revised 6 October 2016; Accepted 27 October 2016

Academic Editor: Pengjun Shi

Copyright © 2016 Renaud Rahier et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Most of plant phospholipases D (PLD) exhibit a C2-lipid binding domain of around 130 amino acid residues at their N-terminal region, involved in their Ca²⁺-dependent membrane binding. In this study, we expressed and partially purified catalytically active PLD α from *Arabidopsis thaliana* (AtPLD α) in the yeast *Pichia pastoris*. The N-terminal amino acid sequence of the recombinant AtPLD α was found to be NVEETIGV and thus to lack the first 35 amino acid belonging to the C2 domain, as found in other recombinant or plant purified PLDs. To investigate the impact of such a cleavage on the functionality of C2 domains, we expressed, in *E. coli*, purified, and refolded the mature-like form of the C2 domain of the AtPLD α along with its equivalent C2 domain of the AtPLD β , for the sake of comparison. Using Förster Resonance Energy Transfer and dot-blot assays, both C2 domains were shown to bind phosphatidylglycerol in a Ca²⁺-independent manner while phosphatidic acid and phosphatidylserine binding were found to be enhanced in the presence of Ca²⁺. Amino acid sequence alignment and molecular modeling of both C2 domains with known C2 domain structures revealed the presence of a novel Ca²⁺-binding site within the C2 domain of AtPLD α .

1. Introduction

Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4) is a lipolytic enzyme which has gradually emerged, over recent decades, as one of the key components of a broad range of cellular and physiological processes (see [1] for review). PLD hydrolyzes the distal phosphodiester bond of glycerophospholipids, leading to the formation of phosphatidic acid (PA) and to the release of a soluble head group. In addition to the hydrolysis reaction, PLD is able to catalyze a transphosphatidylation reaction in which a primary alcohol is transferred to the phosphatidyl moiety of the substrate phospholipid, leading eventually to the formation of the corresponding phosphatidyl alcohol [2].

Historically, plants have been used as an outstanding model for PLD research. Indeed, PLD activity has been originally described in carrot [3] and the gene was cloned for the first time from *Ricinus communis* [4]. These studies have been the premise of PLD research, allowing a subsequent identification and characterization of PLD homologues in a wide range of organisms, from both prokaryotic and

eukaryotic origins, including mammals, yeasts, bacteria, and viruses (see [1] for review).

So far, 12 putative PLD genes have been identified in the plant genetic model *Arabidopsis thaliana* [5, 6]. All these PLDs have been demonstrated to play central roles in seed germination [7, 8], growth and biomass accumulation [9], stress [10, 11], defense [12], and wound healing [13]. Based on their gene architecture, their sequence similarities, and their biochemical properties, these PLDs can be grouped into two major categories. The C2-PLD category comprises 10 PLD genes that harbor a C2 domain, subdivided into α -, β -, γ -, δ -, and ϵ -type PLDs. In contrast, the PX/PH-PLD category presents only 2 PLD genes that contain a phox domain (PX) and a pleckstrin homology (PH) domain, similarly to mammalian PLDs.

The α -type PLD comprises 3 isoforms involved in hyperosmotic stresses [14] and senescence presumably by transducing phytohormone signals [15]. In vitro, α -type PLD from various plant sources has been shown to hydrolyze phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and

phosphatidylglycerol (PG) in the presence of 20 to 100 mM of Ca^{2+} and detergents, at physiological pH [16–21]. Nevertheless, using the recombinant *Ricinus communis* PLD α (RcPLD α), Pappan and Wang [22] also demonstrated that at an acidic pH, α -type PLD has a basal hydrolytic activity towards PC vesicles containing both PE and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), in the absence of Ca^{2+} , and is stimulated by Ca^{2+} concentrations ranging from 10 μM to 500 μM [22]. The β -type PLD, composed of 2 isoforms, has been demonstrated to be implicated in the regulation of actin polymerization/depolymerization and was proposed to play an important role for tip growth of pollen tubes [23]. The γ -type PLD, composed of 3 isoforms, has been shown to be involved in lipid modulation under aluminum stress [24]. In contrast to the α -type PLD, neither β - nor γ -type PLDs require detergent for their activity and are most active in vitro at micromolar calcium concentrations. Nevertheless, both of these isoforms have been demonstrated to hydrolyze PC, PG, and N-acylphosphatidylethanolamine in the presence of PIP₂ and 50 μM of Ca^{2+} , at a physiological pH [16]. Concerning the δ -type PLD, 2 spliced variant isoforms have been identified so far and shown to be involved in defense signaling [12] and freezing tolerance [25]. Similarly to β - and γ -type PLDs, δ -type PLD hydrolyzes PC in the presence of PIP₂ and 50 to 100 μM of Ca^{2+} but is also stimulated by oleate [26]. Unlike the other members of the *Arabidopsis* PLD superfamily, the PLD ϵ represents the unique member of its class. This PLD, which was originally grouped into the α -type subfamily (PLD α 4), appears to promote plant growth by acting on nitrogen signaling [9]. Interestingly, among all plant PLDs, the PLD ϵ is the most permissive in terms of enzyme activity conditions requirements. Indeed, this PLD can be assayed in the presence of detergents and Ca^{2+} concentrations in the mM range but also in the presence of oleate, PIP₂, and μM concentrations of Ca^{2+} [9].

The C2-PLD category presents striking differences in terms of catalytic properties and regulatory processes [5, 6]; all members of this group exhibit a Ca^{2+} -dependent hydrolysis of phospholipids. This feature has been attributed to the presence of the Ca^{2+} -dependent membrane-targeting C2 domain. This domain is an independent folding module of approximately 130 residues long that has been first described as the second conserved domain of the Ca^{2+} -dependent protein kinase C (PKC conserved 2) [27]. Subsequently, an increasing number of C2 domains have been identified in a broad range of membrane-associated proteins, such as Synaptotagmin [28], involved in vesicular trafficking, or the cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) [29, 30] as well as the phospholipase C- δ (PLC δ) [31], both involved in lipid signaling and metabolism.

All of the C2 domains described so far present a conserved β -sandwich fold, composed of eight antiparallel β sheets that can be separated into type I and type II topologies, which slightly differ in their β -strand connectivity [32]. Indeed, the first and the second β -strands (β 1 and β 2) of the type I topology correspond, respectively, to the last and the first β -strands (β 8 and β 1) of the type II topology [32]. Nevertheless, this secondary structure succession is

highly conserved and is connected along with three variable loops, which harbor several acidic residues, identified as Ca^{2+} binding regions (CBR). Indeed, the tertiary structure configuration of C2 domains drives to a spatial proximity of CBRs which act as a Ca^{2+} binding pocket [32, 33]. Therefore, C2 domains are able to specifically bind one to three Ca^{2+} ions, leading to a conformational change of the whole enzyme and, eventually, to its recruitment at the membrane.

Indeed, Ca^{2+} has been shown to regulate proteins behavior as demonstrated for cPLA₂, by slowing down its membrane dissociation constant or, for PKC α , by modulating both its membrane association and dissociation rates. Interestingly, Ca^{2+} binding studies on full lengths cPLA₂ and PKC α , in comparison to their respective C2 domains alone, have shown distinct effect of each bound Ca^{2+} ion on proteins behavior. Indeed, site directed mutagenesis of Ca^{2+} coordinating residues, in association with lipid monolayer and surface plasmon resonance studies, has revealed that one Ca^{2+} -bound to the C2 of the cPLA₂ leads to an intradomain conformational change, which is critical for its membrane penetration, while the other bound Ca^{2+} is not directly involved in the membrane binding [34]. In contrast for PKC α , authors have shown that one Ca^{2+} -bound to the C2 induces an interdomain conformational, implying the whole enzyme and, thus, leading to the membrane binding of non-C2 residues. The other bound Ca^{2+} may be involved in more complex interactions with the membrane, including the binding to phosphatidylserine (PS) [34].

Similarly, C2 domains of plant PLDs have been demonstrated to exhibit several of the conserved acidic residues within their CBRs [32, 33]. However, despite the fact that the recombinant domains are able to bind Ca^{2+} , striking differences can be observed concerning their binding affinities. Indeed, as reported by Zheng et al. [35], the C2 domain from *Arabidopsis thaliana* PLD α (AtPLD α) is able to bind 1 to 3 Ca^{2+} with a low affinity (Kd ranging from 470 to 590 μM) while the C2 Δ 173–190 domain from *Arabidopsis thaliana* PLD β (AtPLD β) harbors 3 Ca^{2+} binding sites with different affinities within its CBRs (Kd₁ = 0.8 μM , Kd₂ = Kd₃ = 24 μM) [35]. Thus, it has been hypothesized that this dissimilar affinity for Ca^{2+} came from the lack of one acidic residue within the CBR1 of the C2 domain of the AtPLD α , due to the substitution of D by Q residue, which could explain the millimolar concentration range of Ca^{2+} required for optimal activity of AtPLD α in vitro [35]. However, a recent study on the C2 domain from tomato PLD α tends to disclaim these properties, demonstrating the existence of two high-affinity binding sites for Ca^{2+} -binding sites (Kd = 59.73 μM) [36].

Interestingly, while the C2 domain of the AtPLD α has been extensively investigated, to our knowledge, only one report on the recombinant expression of the whole enzyme has been performed, so far [37]. Although the resulting enzyme was found to be active, it is worth noting that it was expressed in the prokaryotic expression system *E. coli*, which does not allow several eukaryotic and plants-like posttranslational modifications, such as glycosylation. Therefore, here we report the functional expression of the recombinant AtPLD α in the eukaryotic expression system

P. pastoris. The N-terminal amino acid sequence was subsequently determined and was found to lack the first 35 residues belonging to the C2 domain, as found in other recombinant or plant purified PLDs. Thus, to investigate the impact of such a cleavage on the functionality of plant C2 domains, we subsequently expressed the mature-like form of the C2 domain of the AtPLD α along with its equivalent C2 domain of the AtPLD β , for the sake of comparison. Interestingly, both domains were found to be functional and to be able to bind PG in a Ca²⁺ independent manner while PA and PS binding were found to be enhanced in the presence of Ca²⁺ ions.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Materials. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (POPG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS), and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (POPA) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA). Protino® Ni-TED and NucleoBond® Xtra Midi packed columns were purchased from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Germany). Choline oxidase (from *Arthrobacter globiformis*), horseradish peroxidase (type VI), triolein, and monoclonal anti-poly-Histidine coupled to peroxidase antibody were obtained from Sigma-Aldrich-Fluka Chemie (Saint-Quentin-Fallavier, France). Complete protease inhibitors cocktail tablets were purchased from Roche Diagnostic (Mannheim, Germany). Taq polymerase from *Thermus aquaticus* and Zymolyase 20T were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). KOD DNA polymerase from *Thermococcus kodakaraensis* and pET28b(+) plasmid were obtained from Novagen (MerckKGaA, Darmstadt, Germany). QIAquick PCR Purification Kit was provided by Qiagen (Courtaboeuf, France). BL21-Codon Plus (DE3-) RIPL strain was obtained from Agilent Technologies (Courtaboeuf, France). One Shot TOP10 strain and pGAPZB were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Restriction enzymes were obtained from either Jena Bioscience GmbH (Loebstedter, Germany) or New England Biolabs (Evry, France).

All solutions were prepared using Milli-Q grade water (Millipore, 18.2 M Ω -cm resistivity).

The *Arabidopsis thaliana* full-length cDNA encoding PLD α 1 was a gift from Dr. Wang [35] and the *Arabidopsis thaliana* full-length cDNA encoding PLD β 1 (pdx82318) was provided by the plant genome project at the RIKEN Genomic Sciences Center (Japan).

2.2. pGAPZB Modification and Cloning of AtPLD α . To bring closer together the GAP promoter and the coding sequence, pGAPZB was modified by digestion using EcoRI and KpnI. After purification of the plasmid, cohesive 5' and 3' ends were blunted using T4 DNA polymerase, leading to the reconstruction of the EcoRI site along with the destruction of the KpnI site, and further joined using T4 DNA ligase. Finally, the vector was amplified in *E. coli* TOP10 strain, purified,

and verified by sequencing (Eurofins MWG, Ebersberg, Germany). For subsequent cloning, cDNA sequences coding for the wild type AtPLD α (AtPLD α -WT) and the poly-histidine tagged (6xHis-Tag) AtPLD α (AtPLD α -6xHis) were amplified by PCR, using the same forward primer (TCA-GTCGACAAAAGAATGGCGCAGCATCTGTTGC), carrying the starting codon and harboring the *Sall* restriction site. Both reverse primers were designed with the *NotI* restriction site in the presence of a stop codon for AtPLD α -WT (TGCTGCGGCCGCTTAGGTTGTAAGGATTGGAG or in the absence for AtPLD α -6xHis (TGCTGCGGCCGCGGTTGTAAGGATTGGAG)). Subsequently, purified PCR products and modified pGAPZB were, respectively, digested with *Sall*-*NotI* and *XhoI*-*NotI* and *Sall* and *XhoI* harboring compatible cohesive ends and then ligated using T4 DNA ligase. Finally, constructs were amplified, purified, and verified by sequencing as described above.

2.3. Pichia pastoris Transformation and Cell Lysis. *Pichia pastoris* (X-33 strain) transformation was carried out by electroporation using a Bio-Rad Micropulser, as previously described [38], to obtain recombinant clones transformed by the pGAPZB vector alone or by the vector containing either the AtPLD α -WT or the AtPLD α -6xHis. Proper genomic insertion of the vector containing either the AtPLD α -WT or the AtPLD α -6xHis was checked by PCR using primers located on the GAP promoter and on the *pld*. Alternatively, proper genomic insertion of the pGAPZB vector alone was checked by PCR using primers located on the GAP promoter and the *AOX1* terminator. To follow up the proper expression of the AtPLD α -WT or the AtPLD α -6xHis, PLD activities were monitored directly from crude protein extracts. To do so, PCR-positives clones, transformed by the pGAPZB vector alone or by the vector containing either the AtPLD α -WT or the AtPLD α -6xHis, were grown on YPD medium for 4 days at 30°C and harvested by centrifugation at 5,000 \times g. Subsequently, cells were resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 200 mM sucrose and supplemented with EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics) and 50 μ g/mL Zymolyase. After 1 hour of incubation at 30°C, cells were lysed using a Mini-Beadbeater (Biospec), insoluble material from the crude extract was pelleted by centrifugation at 10,000 \times g, and the soluble fraction was tested for PLD activity.

2.4. PLD Assay and Protein Determination. PLD activity was assayed spectrophotometrically in microtitration plates as previously described [38]. The amount of free choline generated from the PLD-catalyzed hydrolysis of POPC was quantified colorimetrically, after oxidation to betaine by choline oxidase with simultaneous production of hydrogen peroxide, which allows oxidative coupling of 4-aminoantipyrine and sodium 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzene sulfonate by peroxidase to give a maximal absorbance at 500 nm. The substrate solution was prepared by dispersing 1 mM of POPC in an equimolar mixture (3.1 mM) of SDS and Triton X-100. The mixed micelle solution was vortexed for 30 s, sonicated for 10 min using a bath-type sonicator (Deltasonic type O11C,

Fécamp, France), and vortexed again for 30 s. The assay mixture (150 μ L final volume) was composed of 266 μ M POPC, 0.85 mM SDS, 0.85 mM Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5.1 mM 4-aminoantipyrine, 27 mM sodium 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzene sulfonate, 0.5 U choline oxidase, and 0.5 U peroxidase, the protein extract to be tested, and the reaction was initiated by adding 20 mM CaCl₂. The PLD-generated choline was continuously quantified by recording the absorbance at 500 nm, based on a standard curve obtained with pure choline. Control assays were performed simultaneously in the absence of PLD. One unit of PLD activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μ mol of choline per minute under the experimental conditions specified above. Data are expressed as means \pm SD. Statistical significance was determined by Student's unpaired *t*-test (two-tailed). Samples were considered to be significantly different for $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***)). The proteins concentration was routinely determined using Bradford's procedure [39] with Bio-Rad Dye Reagent. Bovine serum albumin was used as the reference protein.

2.5. Purification of Recombinant AtPLD α -WT. For large scale expression of AtPLD α -WT, 50 mL of an overnight *P. pastoris* transformant cell culture was inoculated in 1L of YPD medium and grown at 30°C with orbital shaking (250 rpm) for 6 days. Cells were then harvested by centrifugation at 5,000 \times g and resuspended as described above. Cells were then disrupted by probe sonication and insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 \times g for 20 min at 4°C. The soluble fraction was subsequently dialyzed overnight against 30 mM Pipes buffer, pH 6.2, and 50 mM CaCl₂ and applied onto an octyl-Sepharose CL-4B column (2.5 \times 20 cm) equilibrated in the same Pipes buffer. The column was then washed with 10 column volumes of the same buffer followed by a second wash with a buffer containing 10 mM Pipes, pH 6.2, and 30 mM CaCl₂. The elution of the proteins bound to the column was finally performed with a buffer composed of 10 mM Pipes, pH 6.2, and 0.1 mM EDTA and all purification fractions were assayed for PLD activity. Active fractions were pooled, concentrated by ultrafiltration, and analyzed by SDS-PAGE.

2.6. N-Terminal Sequence Analysis. For N-terminal sequencing, eluted proteins from octyl-Sepharose column were analyzed by SDS-PAGE and subsequently electroblotted onto a PVDF membrane for 1 h at 100 V in 90 mM Tris base, 90 mM Boric acid, 0.1% SDS, and 20% (v/v) ethanol transfer buffer using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). Protein band corresponding to AtPLD α was excised and submitted for Edman degradation using an automatic sequencer model Procise 494A from Applied Biosystems.

2.7. Cloning and Expression of the 6xHis-Tagged C2 α and C2 β Domains. cDNA coding sequences of AtPLD α and AtPLD β were amplified by PCR with KOD polymerase using forward primers harboring a *NcoI* restriction site. An extra methionine was added to the C2 α sequence (TGCACCATGGCAAATGTAGAAGAGACG) while the

second codon of C2 β was changed to insert the new restriction site, leading to the substitution of F residue by V residue (TGCACCATGGTTGGAAGATTGCCAGG). Reverse primers for the amplification of the C2 α domain (TGCTGCGGCCGCTCAACATGGAAATATTGAAGC) and the C2 β domain (TGCTGCGGCCGCATAGGAG-TATACTGAATCG) were designed by inserting a *NotI* restriction site in the absence of stop codon. The amplified fragments were subsequently cloned in the Novagen expression vector pET-28b(+) between *NcoI* and *NotI* sites, flushed with a 3' 6xHis-Tag coding sequence. Constructs were then amplified, purified, and checked by performing DNA sequencing, as described above. All transformations were carried out by electroporation in BL21-CodonPlus® (DE3)-RIPL competent cells, carrying the pRIPL vector. Resulting transformants were grown on LB plates at 37°C, in the presence of kanamycin and chloramphenicol. For the recombinant expression of C2 domains, 2 liters of LB broth was inoculated with 25 mL of an overnight culture, supplemented with appropriate antibiotics. Cells were then grown at 37°C until OD_{600nm} reached ~0.8 and induced overnight by adding 1 mM isopropyl-1-thio- β -galactopyranoside, at 20°C. To evaluate the expression level of both C2 domains, the total proteins extracted from an equivalent of 100 μ L of culture at an OD_{600nm} of 1 was loaded on SDS-PAGE. Cells were finally harvested by centrifugation at 5,000 \times g for 20 min at 4°C and pellets were stored at -20°C, until use.

2.8. Purification of C2 Domains. Cell pellets were resuspended in a buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl, and 5 mM reduced glutathione (GSH). Cells were then harvested by probe sonication for 3 \times 3 minutes on ice and centrifuged at 5,000 \times g for 30 min at 4°C. As C2 domains were expressed in insoluble inclusion bodies, pellets were collected and washed 3 times with phosphate buffer. C2 domains were then solubilized using urea-containing buffer, composed of 50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM GSH, and 8 M urea. Supernatants were collected by centrifugation at 5,000 \times g for 20 min at 20°C and immediately applied onto a Ni-TED column for purification, using manufacturer's instructions. Briefly, columns were washed with the same buffer followed by the elution of C2 domains bound to the column with a buffer composed of 50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl, 5 mM GSH, 8 M urea, and 250 mM of imidazole. Finally, the eluted fractions were applied onto PD-10 desalting columns, exchanging the elution buffer against a buffer containing 50 mM Tris/HCl, pH 8, 5 mM GSH, and 8 M urea, and C2 domains' purity was evaluated on 15% SDS-PAGE (20 μ g of proteins per lane).

2.9. Refolding and Intrinsic Fluorescence Analysis of C2 Domains. Small scale refolding trials were carried out by diluting the denatured C2 domains into the refolding buffer, composed of 50 mM Tris/HCl, pH 8, and 5 mM GSH, and incubated for 1 hour at 20°C. The final concentration of both domains was set at 1 μ M, leading to a final concentration of urea ranging from 50 mM to 75 mM. For the

sake of comparison, both domains were also diluted into the denaturing buffer, corresponding to the refolding buffer but supplemented with 8 M urea. The refolding process was followed by examining the intrinsic fluorescence of both domains, in the absence or in the presence of 8 M urea. Fluorescence experiments were carried out on a Hitachi F-4500 spectrofluorometer in a 1.5 mL quartz cuvette at 20°C. Intrinsic fluorescence spectra were recorded by exciting C2 domains at 280 nm and fluorescence emission wavelengths were scanned from 300 to 500 nm, maintaining both excitation and emission slits widths set at 10 nm. Fluorescence spectra were also recorded in the absence of C2 domains for background corrections due to buffer's Raman scattering. Large scale refolding of C2 domains was carried out as described above, followed by three dialysis steps against the refolding buffer, filtered through a 0.22 μm filter, aliquoted, and stored at -20°C.

2.10. Phospholipid Dot-Blot Assay. Lipids (20 nmol) dissolved in CHCl_3 were spotted onto a PVDF membrane and let to evaporate under fume hood. Similarly, 6xHis-Tagged C2 α or C2 β were also spotted onto a PVDF membrane as a control of the revelation by anti-6xHis antibodies. The membrane was blocked in Tris-buffered saline (TBS) supplemented with fatty acid-free BSA (TBS/BSA) at room temperature for 1 hour and subsequently incubated with refolded C2 α , refolded C2 β , or the refolding buffer alone, diluted in TBS/BSA at 4°C overnight, in the presence of either 1 mM of Ca^{2+} or 1 mM of EDTA. After washing three times with TBS/BSA, the membrane was incubated one hour in the presence of TBS/BSA supplemented with 0.2% of Tween 20. An anti-6xHis mouse monoclonal antibody coupled to peroxidase was subsequently added and incubated at room temperature for 1 hour. Finally, membranes were washed three times with the same buffer and proteins bound to lipids were revealed using a solution composed of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 3% H_2O_2 .

2.11. Förster Resonance Energy Transfer. Relative binding of the C2 α domain and the C2 β domain to phospholipid vesicles was carried out by using the protein to dansyl-PE Förster Resonance Energy Transfer (FRET). To do so, phospholipid liposomes were made by the extrusion method, passing seven times the solution through a 100 nm filter membrane, using a mini extruder (Avanti Polar Lipids). Typical liposomes were composed of the desired phospholipid supplemented with 5% of dansyl-PE. Average hydrodynamic diameters of liposomes, in the absence or in the presence of Ca^{2+} , were checked by performing dynamic light scattering experiments in a 1 mL cuvette on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Relative bindings were examined by mixing 20 μM of liposomes with 1 μM of C2 domain or the buffer alone in a 50 mM HEPES buffer, pH 8, as previously described [36]. All fluorescence experiments were recorded at 30°C using a Tecan Infinite M200 (Salzburg, Austria) microplate fluorescence reader at excitation and emission wavelengths set at 280 nm and 510 nm, respectively, with excitation and emission slits widths set at 10 nm and 20 nm,

respectively. Relative FRET was calculated as $(I - I_0)/I_0$, where I and I_0 correspond to the fluorescence intensity of the C2 domain and the buffer alone, at 510 nm. Effect of Ca^{2+} ions was carried out by adding small proportion of CaCl_2 and incubated 10 minutes at 20°C.

2.12. Secondary Structures Predictions and Molecular Modeling. Predictions of secondary structures of C2 domains were carried out with the Psipred server [40]. Molecular modeling of C2 domains was carried out using the I-tasser server [41] and Ca^{2+} ions were manually added, based on structural alignments of C2 α and C2 β against several C2 domains with known 3D structures, followed by energy minimization using the Chimera software. These C2 domains are identified in the current study with their Protein Data Bank (PDB) entry and correspond to cPLA₂ (1RLW), perforin (3W57), Munc13-1 (3KWU), Car4 (5A50 and 4V29), Car4 (5A52), PKC α (1DSY), PKC β (1A25), rabphilin-3A (2K3H and 2CM5), Synaptotagmin-1 C2A (1BYN), and C2B (1UOV), SV2A (4V11), and Synaptotagmin-7 C2B (3N5A). Membrane interacting residues of these domains were extracted from the OPM database [42] (Orientation of Proteins in Membranes) while C2 α and C2 β docking to membranes was carried out using the PPM server (Peripheral Proteins in Membranes) [42].

3. Results and Discussion

3.1. Yeast Expression of the Recombinant AtPLD α . Based on the previous report on the recombinant expression of the *Vigna unguiculata* PLD α (VuPLD α) [38], we cloned the full-length cDNA encoding the AtPLD α into the pGAPZB vector, in the absence (AtPLD α -WT) or in the presence of a carboxyterminal polyhistidine tag (AtPLD α -6xHis), for the constitutive expression in the yeast *Pichia pastoris*. In contrast to the prokaryotic *E. coli* expression system, *P. pastoris* is a eukaryotic organism that appears very effective for the recombinant expression of eukaryotic proteins [43], allowing various posttranslational modifications such as glycosylation.

Thus, *P. pastoris* (X-33 strain) transformation yielded several colonies harboring a correct genomic recombination, as confirmed by PCR, with the pGAPZB containing the coding sequence of either the AtPLD α -WT or the AtPLD α -6xHis or with the empty vector, serving as the negative expression control. To investigate the functional expression of both recombinant AtPLDs, PCR-positives clones were grown for several days and further assayed for PLD activity. Therefore, as shown in Figure 1(a), crude extracts of *P. pastoris* transformed with the AtPLD α -WT exhibited a higher PLD activity, in comparison to the negative control. Besides the time course expression of the AtPLD α -WT showed an increasing specific PLD activity as function of culture time and reaching a maximum at 7 days of culture (data not shown). Interestingly, this result contrast with the previously reported VuPLD α expression pattern that showed a rapid increase of PLD activity with a maximum reached after 3 days of culture [38]. Nevertheless, this result indicates a functional

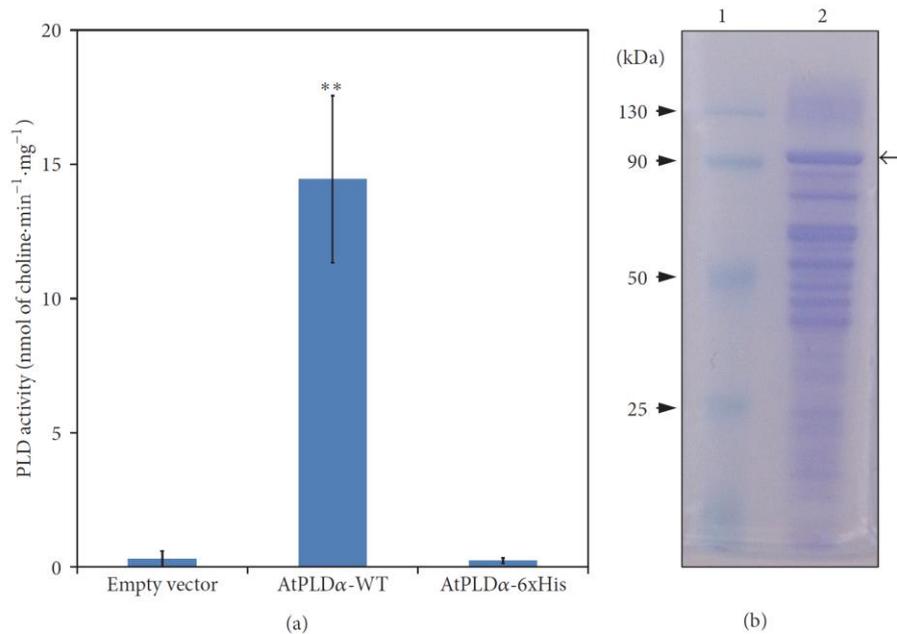


FIGURE 1: (a) Recombinant AtPLD α activity in crude protein extracts of *Pichia pastoris* transformed with the empty vector or expressing either the recombinant AtPLD α -WT or the AtPLD α -6xHis, after 4 days of culture, and using POPC (0.26 mM, final concentration) as the substrate. Values presented are the means \pm SD obtained from four independent PCR-positive clones. ** $P < 0.01$ (versus blank). (b) SDS-PAGE (10% acrylamide) analysis of the recombinant AtPLD α -WT purified using the purification procedure with octyl-Sepharose CL-4B column (2.5 \times 20 cm) (see Materials and Methods). Lane 1: molecular mass marker, lane 2: eluted fraction containing the recombinant AtPLD α -WT. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 to reveal the proteins. The arrow on the right indicates the position of the AtPLD α -WT.

expression of the AtPLD α -WT and suggests that *P. pastoris* is a well-adapted expression system for the recombinant production of plants PLDs.

It is worth noting that, under the same experimental conditions, no PLD activity could be observed in crude extracts of *P. pastoris* transformed with the sequence coding for AtPLD α -6xHis (Figure 1(a)), thus suggesting either a misfolding of the protein due to the 6xHis-tag or a wrong genomic insertion of the cDNA. Interestingly, these results are in line with the previous report of Schäffner et al. [44] who showed that, using the recombinant BoPLD α 1 and BoPLD α 2, the addition of an amino- or carboxyterminal tag yielded inactive enzymes.

3.2. Partial Purification and N-Terminal Amino Acid Sequencing of Recombinant AtPLD α . To further characterize the recombinant AtPLD α -WT, we used the property of plant PLDs to strongly bind hydrophobic supports such as octyl-Sepharose in the presence of calcium as previously reported [38, 44–50]. The PLD activity was eluted by chelating the Ca²⁺ ions with EDTA. Partially purified recombinant AtPLD α -WT was obtained, as attested by a major protein band observed in the SDS-PAGE analysis (Figure 1(b), arrow), corresponding to a molecular mass, as expected, of around 90 kDa. However, despite a harshly wash of the octyl-Sepharose column during the purification process, an important proportion of contaminant proteins were found in the obtained AtPLD α -WT containing elution fractions. Concerning the analysis of

the AtPLD α -WT (Figure 1(b), arrow), the protein band was subject to Edman degradation and the obtained N-terminal sequence was found to be NVEETIGV. This N-terminal sequence analysis is a clear evidence for the identification of the AtPLD α -WT, since BLAST analysis against *Pichia*'s genome did not return results, while this sequence perfectly matches with the AtPLD α -WT. As shown in Figure 2, this amino acid sequence corresponds to positions 36 to 43 of the AtPLD α -WT and was found to be very similar to the previously obtained N-terminal sequence of the recombinant VuPLD α expressed in *P. pastoris* [38].

Taking into account the observed N-terminal cleavage and starting from residue 36, the resulting AtPLD α -WT is expected to have a molecular mass of 88.1 kDa (775 amino acid residues), thus contrasting with the observed molecular mass on SDS-PAGE (see Figure 1(b)). Nonetheless, the AtPLD α -WT contains one potential N-glycosylation site that may explain the observed difference in the molecular mass. Indeed, since the addition of single N-linked glycans adds \sim 2.5 kDa [51], the AtPLD α -WT is expected to reach an apparent molecular mass of around 90.6 kDa, corresponding thus to the one estimated from SDS-PAGE analysis (see Figure 1(b)).

The *in vivo* glycosylation of α -type PLDs has been demonstrated for the *Glycine max* PLD α (GmPLD α) [48] that reacts with lectins but also with antibodies directed against complex Asn-linked glycans [48]. Besides, a similar glycosylation pattern was found for the *Helianthus annuus* PLD α (HaPLD α) and the *Brassica oleracea* PLD α (BoPLD α)

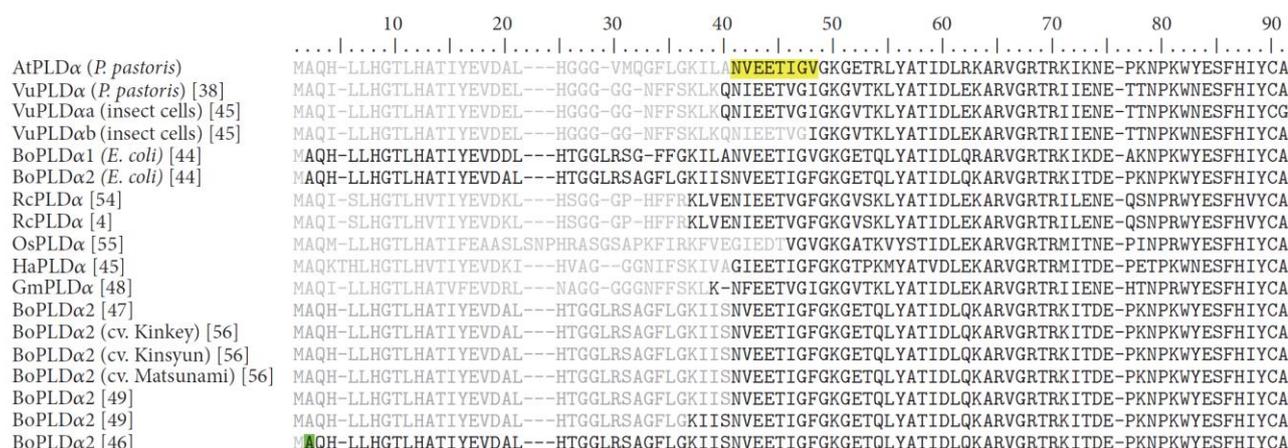


FIGURE 2: Protein sequence alignment of the N-terminal region of purified α -type PLDs reported so far. Grey-colored residues represent predicted sequences deduced from cDNAs and absent in mature PLD forms (black-colored residues). Residues highlighted in yellow come from the Edman degradation sequencing obtained in this study while the posttranslational acetylated residue is highlighted in green.

(Abousalham et al., unpublished data), purified as previously described [45, 47]. The glycosylation character of these enzymes was established by performing Western blotting, either by reacting HaPLD α and BoPLD α with specific lectins, such as concanavalin A, wheat germ agglutinin, or *Lens culinaris* agglutinin, or using anti-glycan polyclonal antibodies. The later strategy used fractionated horseradish peroxidase antibodies, purified on an affinity column of honeybee venom phospholipase A₂, to produce serum fractions that are specific for the $\alpha(1,3)$ -fucose epitopes [52]. In plants, the $\alpha(1,3)$ linked fucose is commonly found in complex Asn-linked glycans and paucimannosidic Asn-linked glycans [53] and is added in the Golgi apparatus.

Besides, *P. pastoris* is able to recognize the consensus sequence Asn-X-Ser/Thr (where X is any amino acid except proline), which constitute the N-glycosylation sites in yeast but also in mammals and in plants [53], explaining why the recombinant VuPLD α , expressed either in *P. pastoris* [38] or in insect cells [45], was also found to be glycosylated.

Interestingly, a significant number of studies have reported this kind of cleavage on α -type PLDs purified from plant tissues. Indeed, this phenomenon has been first reported by Wang et al. [4, 54] for the RcPLD α and subsequently described for the PLD α from *Oryza sativa* (OsPLD α) [55], GmPLD α [48], and HaPLD α [45] as well as for both BoPLD α 1 and BoPLD α 2 [47, 49, 56]. However, in a more recent study, Schöps et al. [46] have reported an N-terminal acetylation of the second residue of the BoPLD α 2, which may explain why attempts to sequence the N-terminal part of the PLD α from *Brassica napus* (BnPLD α) [57] and *Arachis hypogaea* (AhPLD α) [58] did not give results. Oppositely, the recombinant expression in *E. coli* of both BoPLD α 1 and BoPLD α 2 was found to lead to the production of full-length enzymes [44]. Therefore, authors suggested that the observed cleavage may come from a proteolytic degradation during the purification process. Nevertheless, using the insect cells expression system, El Maarouf et al. [45] also reported the purification of two forms of the recombinant VuPLD α with

distinct N-terminal cleavage sites (VuPLD α a and VuPLD α b). Interestingly, both forms were found to be secreted in the culture medium without the addition of a secretion peptide, leading authors to hypothesize that the N-terminal part of α -type PLDs may act as a leader peptide.

Although the mechanism of such a cleavage or degradation needs further insights, this phenomenon may come from the action of some proteases towards the C2 domain of the PLD α . Indeed, in a previous study, Simões et al. [59] reported the interaction between the PLD α from *Cynara cardunculus* and cardosin A, an aspartic proteinase which accumulates in protein storage vacuoles [59]. This specific interaction was found to occur within the C2 domain via both a RGD motif and a KGE motif, present in the cardosin A, and resulted in the proteolysis of the GST N-terminal tagged recombinant C2 domain of the *C. cardunculus* PLD α upon dissociation of the complex [59]. Interestingly, *P. pastoris* presents several vacuolar proteases that harbor this RGD or KGE motif which is, in a surprising manner, also found in the CBR1 of the AtPLD α C2 domain.

3.3. Expression, Purification, and Refolding of N-Terminal C2 Domains from AtPLD α and AtPLD β . Because the exact nature of the removed N-terminal part of α -type PLDs remains elusive, we wondered about the impact of such cleavage on the functionality of the C2 domains. To investigate further this concern, we subsequently expressed the mature-like form of the C2 domains from AtPLD α (C2 α) along with its equivalent C2 domain from AtPLD β (C2 β), based on protein sequence alignments, for the sake of comparison. Expression of C2 α and C2 β in BL21 cells resulted in a rapid accumulation of proteins in inclusion bodies as shown by SDS-PAGE analysis of *E. coli* crude protein extracts expressing either the C2 α (Figure 3(a), lane 3) or the C2 β (Figure 3(a), lane 4). Therefore, C2 α and C2 β were solubilized under denaturing conditions using urea and subsequently purified by affinity chromatography using Ni²⁺

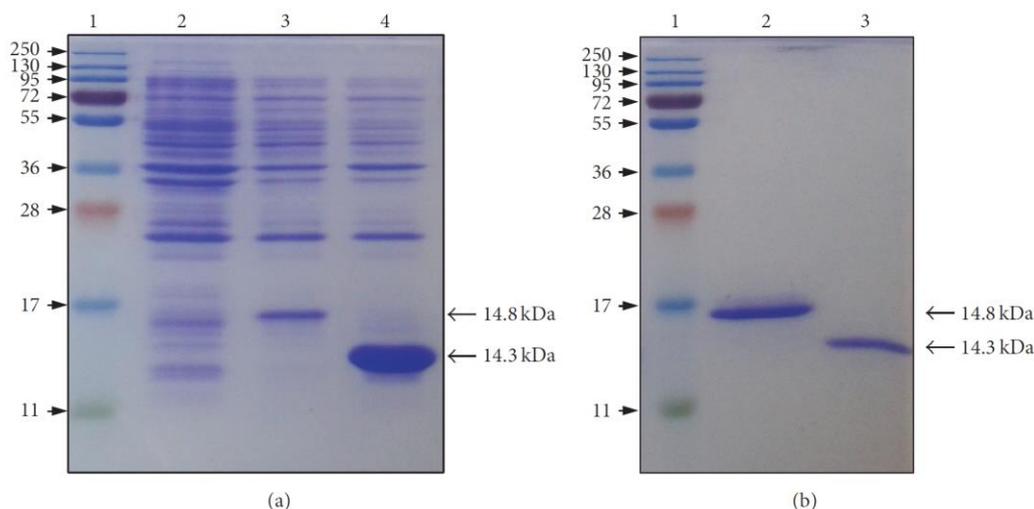


FIGURE 3: (a) SDS-PAGE analysis of crude protein extracts from *E. coli* cells expressing either the C2 α domain or the C2 β domain, in comparison to the empty vector as expression control. Lane 1: molecular mass marker, lane 2: empty vector, lane 3: C2 α domain, and lane 4: C2 β domain. (b) SDS-PAGE analysis of affinity purified C2 α domain and C2 β domain. Lane 1: molecular mass marker, lane 2: C2 α domain, and lane 3: C2 β domain. Protein migrations were performed using 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

affinity resins. SDS-PAGE analysis of purified C2 α and C2 β devoid of any detectable contaminants gave a single protein band at a position corresponding to a molecular mass of 14.8 (Figure 3(b), lane 2) and 14.2 kDa (Figure 3(b), lane 3), respectively. Pure C2 domains were subsequently refolded by rapid dilution at low protein concentration in a urea-free buffer and extensively dialyzed to remove urea. However, subsequent concentration attempts by ultra-filtration led to an important protein precipitation, yielding a poor recovery of both C2 domains. The addition of chemical reagents such as arginine or N-lauroylsarcosine were found to drastically enhance the protein solubility; however, both C2 domains were prone to aggregate during subsequent dialysis.

In these experimental conditions, the maximal concentration that could be obtained was found to be 5 μM (7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for the C2 α and 9 μM (13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for the C2 β . Despite the low protein concentration obtained, the refolding process of these domains could be followed using their intrinsic fluorescence. Protein unfolding usually leads to the exposure of fluorescent residues (Trp/Tyr), resulting in a modification of the fluorescence signal and a shift of the emission peak. Interestingly, in the presence of 8 M urea, the two denatured C2 domains present a striking difference of their fluorescence emission maxima, corresponding to λ_{max} of 349 nm for the C2 α (Figure 4(a), red curve) and λ_{max} of 345 nm for the C2 β (Figure 4(b), red curve). Upon reduction of urea concentration, both domains present a blue shift of their fluorescence emission maxima, along with a change in their fluorescence intensity. As shown in Figure 4, the C2 α presents a fluorescence emission maximum at λ_{max} of 340 nm with a concomitant intensity decrease (Figure 4(a), blue curve) while the C2 β presents an emission maximum at λ_{max} of 335 nm along with an increase of its fluorescence intensity (Figure 4(b), blue curve). Thus, both domains showed a decreasing emission maximum wavelength of approximately

10 nm upon denaturant removal, which is usually associated with a burial of tyrosine and tryptophan residues in a more hydrophobic environment, indicating a proper refolding.

3.4. C2 Domains-Phospholipids Binding Assay. To investigate further the impact of the loss of the N-terminal part on the C2 domains properties, the Ca $^{2+}$ -dependent or -independent binding of both C2 α and C2 β towards phospholipids was examined using the phospholipid dot-blot technique, as indicated in Materials and Methods. As shown in Figure 5(a), both C2 domains clearly bound to anionic phospholipids (PS and PA) in the presence of 1 mM of Ca $^{2+}$. Conversely, the C2 α bound PG with high affinity in the absence of Ca $^{2+}$ and the affinity decreased upon the addition of Ca $^{2+}$.

These results were further confirmed by FRET experiments, using dansyl-PE labeled liposomes (Figure 5(b)). In these experiments, tryptophan of the C2 domains serves as the donor of fluorescence that is transferred to the dansyl acceptor upon binding to phospholipid vesicles. As shown in Figure 5(b) and as expected, both C2 domains were found to bind anionic phospholipids (PA and PS) in the presence of Ca $^{2+}$, while no affinity could be observed for neutrally charged phospholipids, PC and PE, in either the presence or the absence of Ca $^{2+}$. Interestingly, in the absence of Ca $^{2+}$, both C2 domains showed a strong binding to PG vesicles that was not influenced by the addition of Ca $^{2+}$. Similarly, a slight binding to PS vesicles and a much more pronounced binding to PA vesicles could be observed for both C2 domains, in the absence of Ca $^{2+}$ (Figure 5). It is worth noticing that, in contrast to PG vesicles, the addition of Ca $^{2+}$ was found to enhance binding of both C2 domains to PA and PS (Figure 5). Nevertheless, in comparison to the C2 α , the C2 β appeared to require a much less important Ca $^{2+}$ concentration for an efficient binding to PS vesicles.

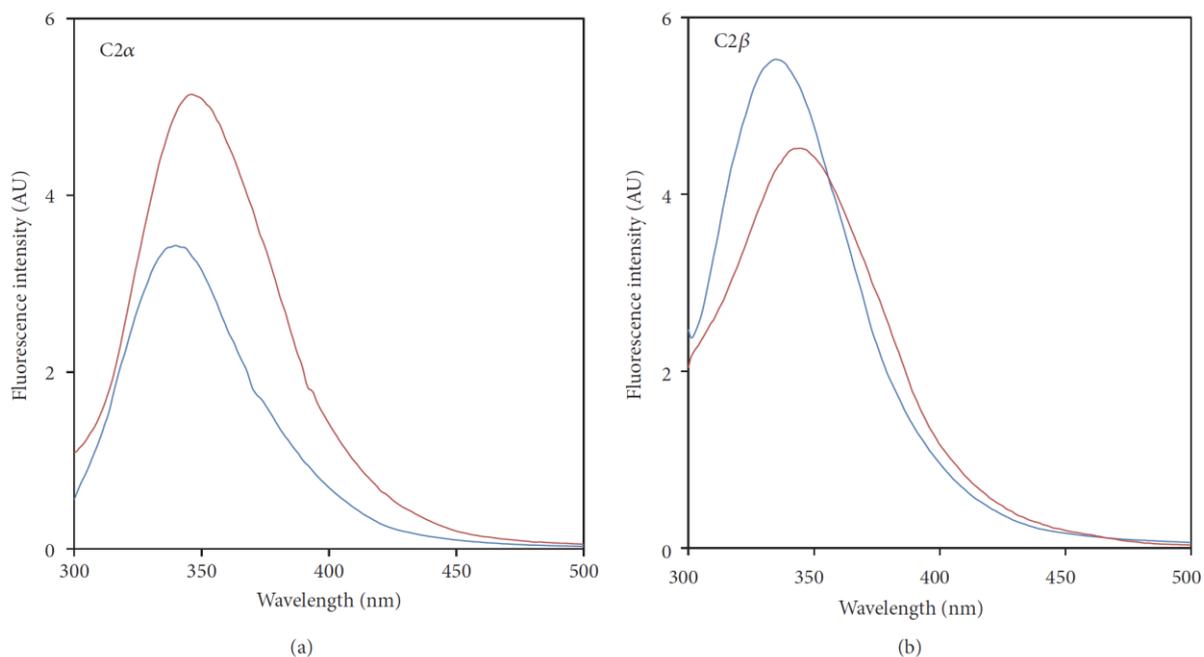


FIGURE 4: Intrinsic fluorescence spectra (λ_{ex} 280 nm) of urea-denatured C2 α domain (a) and C2 β domain (b) diluted in a Tris/HCl buffer containing (red curves) or not (blue curves) 8 M urea and after 1 h of incubation at room temperature. The final concentration of both domains was set at 1 μ M, leading to a final concentration of urea ranging from 50 mM to 75 mM for blue curves. Fluorescence intensity was expressed in arbitrary units (AU) and bandwidths were set at 10 nm for both excitation and emission.

In contrast to the Ca²⁺-independent phospholipids binding of the C2 domain of tomato PLD α [36], these results are in line with the previous report by Zheng et al. [35], who demonstrated that both the recombinant full-length C2 α of AtPLD α and C2 $\beta^{\Delta 173-190}$ of AtPLD β were able to bind PS containing vesicles in a Ca²⁺-dependent fashion, *in vitro* [35]. Similar to the present study, C2 $\beta^{\Delta 173-190}$ was found to require much less Ca²⁺ to bind PS vesicles than the C2 α . This Ca²⁺-dependent binding to PS was thus proposed to be involved in the recruitment of PLDs to the membrane, as demonstrated for the C2 domain of the PKC α [60]. Interestingly, the binding to PA and PG vesicles of the C2 α and the C2 β presented in this study is also in line with the previous report on the activation of the BoPLD α by PA and PG [61] as well as of the HaPLD α by PG [20]. This behavior was also demonstrated by Majd et al. [62], who proposed a novel interfacial kinetic model for PLDs, taking into account the activating role of the newly PLD-generated PA. In this model, the PLD activity towards the PC substrate starts with a slow activity phase, which gradually accelerates upon PA accumulation. Interestingly, it is well known that both SDS and Triton X-100 are found to be critical for an optimal PLD activity, *in vitro* [63]. Also, the addition of these detergents to phospholipids leads to an optimal substrate accessibility through the formation of mixed micelles; we can hypothesize that the negative charge of SDS may mimic PA, thus leading to the activation of α -type PLDs.

3.5. Secondary Structure Prediction and Molecular Modeling of C2 α and C2 β . C2 α and C2 β are expected to present

the 8 conserved β strands, as demonstrated by their secondary structure predictions (Figure 6(a)). However, all C2 domains from plant PLDs present, in addition, an extra region between the two predicted $\beta 1$ and $\beta 2$ strands. This singular characteristic relies on an insertion of 15 to 20 amino acid residues that has been previously [35] proposed to fold as an α -helix and that agrees with the proposed prediction (Figure 6(a)). Interestingly, the observed cleavage on the recombinant AtPLD α appears to occur at the end of the predicted helix, indicated by an arrow in Figure 6(a).

Therefore, to investigate further the property of the predicted α -helix, three-dimensional (3D) structures of both the C2 α and the C2 β were modeled, based on their secondary structure prediction. As expected, both C2 domains present a β -sandwich fold (Figures 6(b) and 6(c)), composed of 8 antiparallel β sheets along with the predicted helix. Interestingly, this helix was found to adopt an amphipathic pattern, exhibiting its hydrophobic side outwards from the surface, in a similar manner to the one occurring in the C2 domain of the cPLA₂ [64], which may explain the observed Ca²⁺-independent membrane binding of the full-length C2 domain from tomato PLD α [36]. Besides, in the structure of the C2 domain of the cPLA₂, the hydrophobic part of the helix appears to interact with the membrane, surrounding the Ca²⁺-binding pocket, and is directly followed by the first Ca²⁺-binding D residue [64]. Interestingly, structural alignments between the two modeled domains and various known C2 domain structures showed a similar structure, allowing us to append Ca²⁺ to CBRs and to predict Ca²⁺-binding residues. Thus, as shown in Figure 6, C2 α and

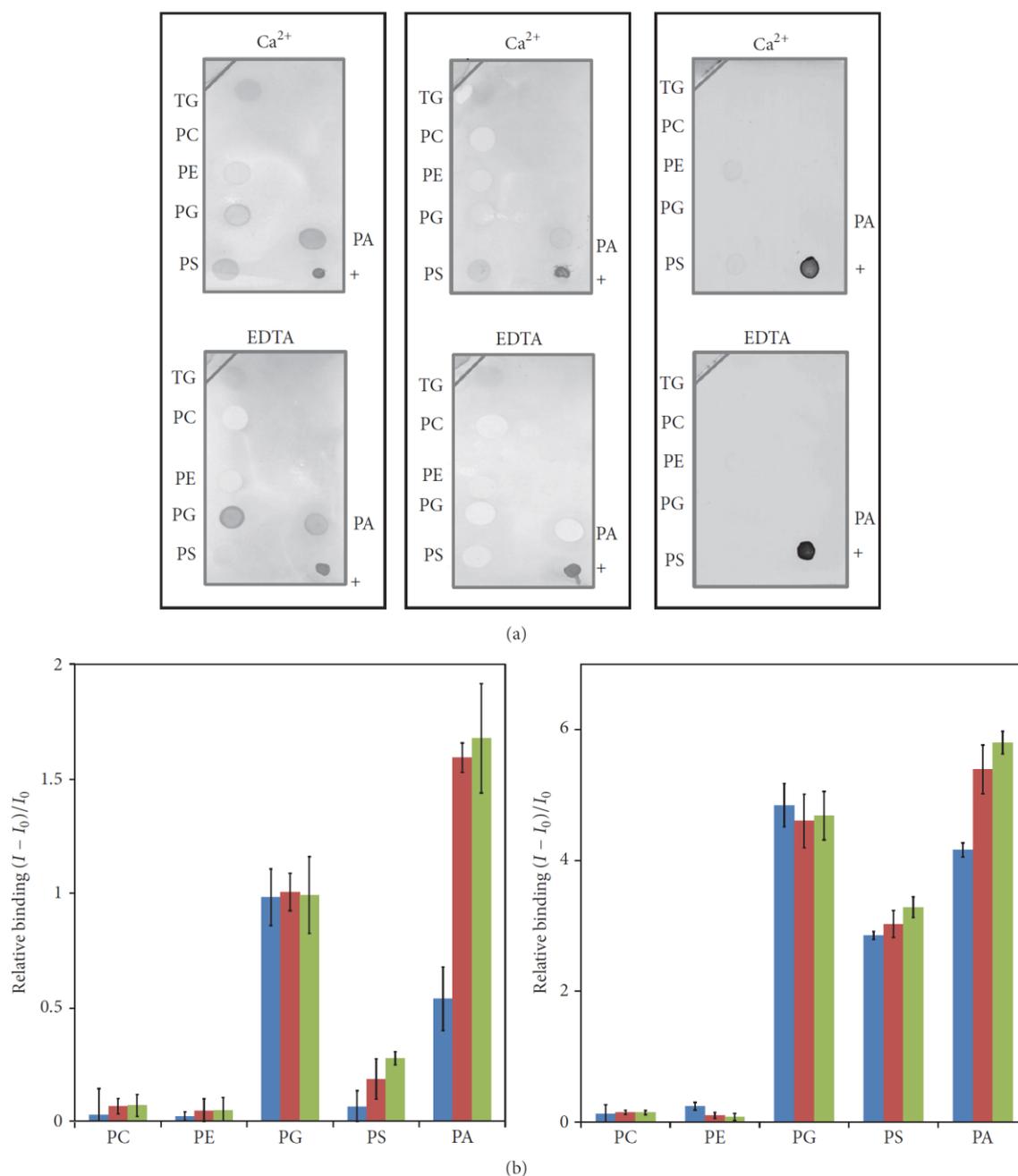


FIGURE 5: (a) Lipid blot analysis of the interaction of the C2 α (left panel) and the C2 β (middle panel) in the presence of 1 mM of Ca²⁺ or 1 mM of EDTA, in comparison to the dialysis buffer serving as the negative control (right panel). Lipids were spotted onto a PVDF membrane and interactions were revealed using an anti-6xHis antibody, as described in the experimental procedures. TG: triglyceride, +: positive control made by spotting 6xHis-C2 domain protein. (b) Relative binding of the C2 α (left panel) and the C2 β (right panel) to phospholipids vesicles, using the protein to dansyl-PE FRET. Blue bars: no Ca²⁺ added, red bars: 50 μ M of Ca²⁺, and green bars: 200 μ M of Ca²⁺. Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments.

C2 β were found to exhibit the conserved D residues of the CBR3 (D97 and D98 for the C2 α and D109 and D111 for the C2 β) but, in contrast, presented striking difference in their CBR1. Indeed, while the C2 β harbors the conserved D residues within its CBR1 (D34 and D62, Figures 6(a) and

6(c)), the C2 α shows a D to Q substitution (Q49, Figures 6(a) and 6(b)), as previously described [35]. Nevertheless, a novel Ca²⁺-binding (E38) site within the sequence motif "NVEE" could be identified just after the first helix of the C2 α (Figure 6(a)), similar to the first Ca²⁺-binding D

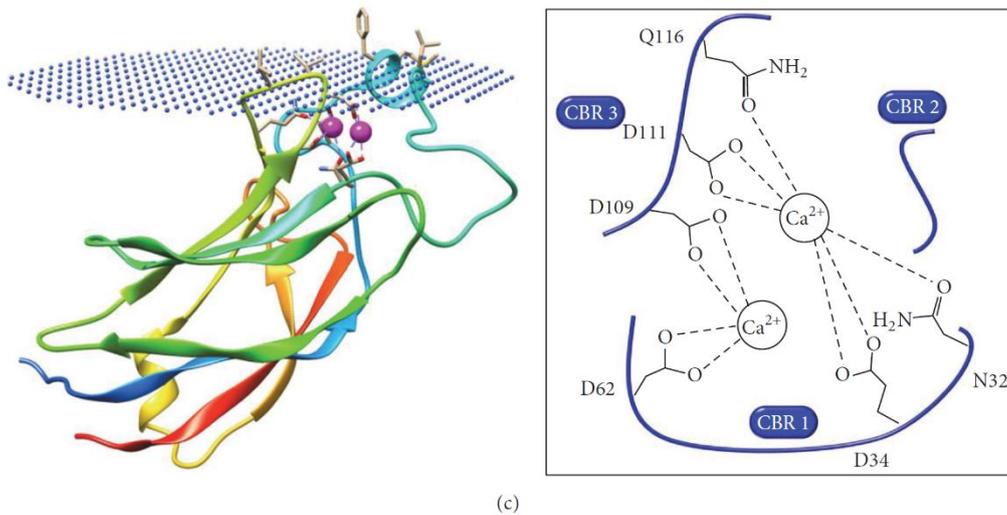


FIGURE 6: (a) Multiple sequence alignment of C2 domains. Amino acid sequences of C2 α and C2 β were aligned with various known C2 domain structures (see Materials and Methods). Residues highlighted in red represent Ca²⁺ binding residues extracted from structures and residues highlighted in green represent membrane binding residues extracted from the OPM database. The proposed α -helix between β 1 and β 2 strands is indicated in blue. CBR: Ca²⁺ binding region. Strand β 0, colored in yellow, corresponds to the first β strand present in typology I. The observed cleavage on the recombinant AtPLD α is indicated by the arrow (red). The PDB entries correspond to cPLA₂ (1RLW), perforin (3W57), Munc13-1 (3KWU), Car4 (5A50 and 4V29), Car4 (5A52), PKC α (1DSY), PKC β (1A25), rabphilin-3A (2K3H and 2CM5), Synaptotagmin-1 C2A (1BYN), and C2B (1UOV), SV2A (4V11), and Synaptotagmin-7 C2B (3N5A). Modeled structures of the C2 α domain (b) and the C2 β domain (c), using the I-tasser server and docked to membrane (dummy) using the PPM server. Ca²⁺ is colored in pink.

residue of the C2 domain of the cPLA₂ [64], suggesting that the C2 α may present a functional CBRI. Interestingly, this Ca²⁺-binding motif is highly conserved among the α -type PLDs (see Figure 2) and remains present in the mC2 α as well as in the matured form of the AtPLD α -WT, thus explaining the requirement of a complete chelating of Ca²⁺ during the elution step of the purification process. Besides, this finding is in line with the previous report on the VuPLD α produced in insect cells, which showed distinct N-terminal cleavage sites along with different binding properties towards hydrophobic supports in the presence of Ca²⁺. Indeed, the 3-day postinfection purified form, VuPLD α , exhibited an N-terminal sequence similar to the VuPLD α expressed and purified in *P. pastoris* and required the total chelating of Ca²⁺ to be eluted from the octyl-Sepharose column [45]. In contrast, the 4-day postinfection purified form, VuPLD α b, showed an extra cleavage site of 8 more residues, including the newly predicted Ca²⁺-binding residue, and could be eluted in the presence of only 30 mM of Ca²⁺, suggesting that the CBRI of the C2 domain was affected [45]. Interestingly, the presence of this Ca²⁺-binding site in the mC2 α can also explain the observed Ca²⁺-dependent binding to PA and PS, similar to the C2 domain of the PKC α [60]. In contrast, the Ca²⁺-independent binding of mC2 α and mC2 β to PG suggests the presence of an additional lipid binding site within the C2 domain. This second binding site can correspond to the polybasic motif, previously identified as a Ca²⁺-independent PIP₂ binding motif [35]. Indeed, as demonstrated on the 3D

structure of the C2 domain of the PKC α [65], this motif was shown to present several basic residues, within the β 3 strand (Figure 6(a), 1DSY), which taken together form a highly positively charged patch, thus enabling the binding of anionic phospholipids. Interestingly, this second site may also explain the slight Ca²⁺-independent binding to PS and PA of both domains observed in the current study and as previously reported for PS vesicles [35]. Nevertheless, while the C2 α exhibits several basic residues within its β 3 strand (Figure 6(a)), the C2 β harbors only one R residue, R76, (Figure 6(a)). Therefore, this slight Ca²⁺-independent binding to anionic phospholipids may also be explained by the presence of the K residue (K96 and K108, resp., for the C2 α and the C2 β), juxtaposed to the conserved D of the CBR3 of the two domains (Figure 6(a)), as demonstrated by Ananthanarayanan et al. [66], for the PLC- δ 4. Indeed, this isoform harbors two cationic residues, present within its CBR3, which have been shown to be involved in non-specific electrostatic interactions with anionic phospholipids [66].

Therefore, both C2 domains (mC2 α and mC2 β) may target the membrane through two different binding sites with variable affinities as function of the Ca²⁺ availability and of the lipid composition of membranes. In addition, these two domains may be anchored in the membrane via hydrophobic residues present near the CBR3, as found using the PPM prediction server (Figure 6(a)), even when the amphipathic helix of the CBR1 is removed. Indeed, hydrophobic residues of the CBR3 appear highly conserved in an important number

of C2 domains (Figure 6(a)) and are thought to be critical for an efficient membrane binding.

4. Conclusion

We report here the functional expression of the recombinant AtPLD α in the eukaryotic system *P. pastoris*. Interestingly, while the addition of a C-terminal 6xHis-tag did not give any detectable enzyme, the wild type AtPLD α was found to be expressed as an active form, confirming the efficiency of *P. pastoris* for the heterologous production of plant PLDs. In addition, the N-terminal amino acid sequencing of the recombinant AtPLD α demonstrated an N-terminal cleavage, at the beginning of the C2 domain, which appears highly similar to the previously purified α -type PLDs.

The mature-like form of the C2 domains C2 α and C2 β were expressed in *E. coli*, purified, and refolded. Both C2 domains were found to be functional and to be able to bind PG in a Ca²⁺-independent manner while PA and PS bindings were found to be enhanced in the presence of Ca²⁺. Such bindings were found to be in line with the previously activating roles of these phospholipids towards α -type PLDs and indicated, in addition, that the matured-like C2 domain of the AtPLD α presents all of the conserved Ca²⁺ binding residues. Indeed, molecular modeling of the C2 α domain 3D structure predicted the presence of a novel Ca²⁺ binding site which may replace the D to Q substitution, within the CBR1. Interestingly, this binding site was found to be highly conserved among α -type PLDs and can explain the different binding affinities of the two forms of VuPLD, expressed in insect cells, towards hydrophobic supports in the presence of Ca²⁺.

Taken together, these results suggest that α -type PLDs present complete C2 domains that harbor all of the conserved acidic Ca²⁺-binding residues within their CBR1 and CBR3. Besides, our data indicate that these C2 domains are able to bind anionic phospholipids, which is in line with the previous reports on the activation effect of these lipids on the α -type PLDs. It can thus be hypothesized that α -type PLDs are regulated by their C2 domains through both Ca²⁺ dependent and Ca²⁺-independent binding to anionic lipids.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The French Ministry of Science and Education is gratefully acknowledged for the funding of Renaud Rahier. The authors would like to thank Professor Loïc Blum and the GEMBAS team (ICBMS, France) for kindly allowing them to use the Tecan Infinite M200. The authors are grateful to P. Mensuelle (Plate-forme Protéomique de l'IMM, Marseille) for N-terminal sequence analysis. The authors would also like to thank the FENNEC team members (Institut Lumière Matière, France) for dynamic light scattering experiments.

References

- [1] P. E. Selvy, R. R. Lavieri, C. W. Lindsley, and H. A. Brown, "Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 10, pp. 6064–6119, 2011.
- [2] S. F. Yang, S. Freer, and A. A. Benson, "Transphosphatidylolation by phospholipase D," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 242, no. 3, pp. 477–484, 1967.
- [3] D. J. Hanahan and I. L. Chaikoff, "The phosphorus-containing lipides of the carrot," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 168, no. 1, pp. 233–240, 1947.
- [4] X. Wang, L. Xu, and L. Zheng, "Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L.," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 32, pp. 20312–20317, 1994.
- [5] X. Wang, "Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions," *Progress in Lipid Research*, vol. 39, no. 2, pp. 109–149, 2000.
- [6] M. Li, Y. Hong, and X. Wang, "Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1791, no. 9, pp. 927–935, 2009.
- [7] J. H. Dyer, S. B. Ryu, and X. Wang, "Multiple forms of phospholipase D following germination and during leaf development of castor bean," *Plant Physiology*, vol. 105, no. 2, pp. 715–724, 1994.
- [8] S. B. Ryu, L. Zheng, and X. Wang, "Changes in phospholipase D expression in soybeans during seed development and germination," *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 73, no. 9, pp. 1171–1176, 1996.
- [9] Y. Hong, S. P. Devaiah, S. C. Bahn et al., "Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance Arabidopsis nitrogen signaling and growth," *Plant Journal*, vol. 58, no. 3, pp. 376–387, 2009.
- [10] W. Frank, T. Munnik, K. Kerkmann, F. Salamini, and D. Bartels, "Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*," *The Plant Cell*, vol. 12, no. 1, pp. 111–123, 2000.
- [11] Y. Sang, D. Cui, and X. Wang, "Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in Arabidopsis," *Plant Physiology*, vol. 126, no. 4, pp. 1449–1458, 2001.
- [12] F. Pinoso, N. Buhot, M. Kwaitaal et al., "Arabidopsis phospholipase Ddelta is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi," *Plant Physiology*, vol. 163, no. 2, pp. 896–906, 2013.
- [13] S. B. Ryu and X. Wang, "Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves," *Biochimica et Biophysica Acta—Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1303, no. 3, pp. 243–250, 1996.
- [14] Y. Hong, X. Pan, R. Welti, and X. Wang, "Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in Arabidopsis," *The Plant Cell*, vol. 20, no. 3, pp. 803–816, 2008.
- [15] L. Fan, S. Zheng, and X. Wang, "Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest arabidopsis leaves," *The Plant Cell*, vol. 9, no. 12, pp. 2183–2196, 1997.
- [16] K. Pappan, S. Austin-Brown, K. D. Chapman, and X. Wang, "Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D α , - β , and - γ ," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 353, no. 1, pp. 131–140, 1998.

- [17] A. J. Moreno-Pérez, E. Martínez-Force, R. Garcés, and J. J. Salas, "Phospholipase D α from sunflower (*Helianthus annuus*): cloning and functional characterization," *Journal of Plant Physiology*, vol. 167, no. 7, pp. 503–511, 2010.
- [18] M. Dippe and R. Ulbrich-Hofmann, "Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity," *Analytical Biochemistry*, vol. 392, no. 2, pp. 169–173, 2009.
- [19] K. M. Ella, K. E. Meier, A. Kumar, Y. Zhang, and G. P. Meier, "Utilization of alcohols by plant and mammalian phospholipase D," *Biochemistry and Molecular Biology International*, vol. 41, no. 4, pp. 715–724, 1997.
- [20] S. Abdelkafi and A. Abousalham, "The substrate specificities of sunflower and soybean phospholipases D using transphosphatidyl transfer reaction," *Lipids in Health and Disease*, vol. 10, article no. 196, 2011.
- [21] R. Rahier, A. Noiriel, and A. Abousalham, "Development of a direct and continuous phospholipase D assay based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline," *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 1, pp. 666–674, 2016.
- [22] K. Pappan and X. Wang, "Plant phospholipase D ϵ is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca²⁺ concentrations," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 368, no. 2, pp. 347–353, 1999.
- [23] R. Pleskot, M. Potocký, P. Pejchar et al., "Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton," *The Plant Journal*, vol. 62, no. 3, pp. 494–507, 2010.
- [24] J. Zhao, C. Wang, M. Bedair et al., "Suppression of phospholipase D γ s confers increased aluminum resistance in *Arabidopsis thaliana*," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, Article ID e28086, 2011.
- [25] W. Li, M. Li, W. Zhang, R. Welti, and X. Wang, "The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*," *Nature Biotechnology*, vol. 22, no. 4, pp. 427–433, 2004.
- [26] C. Wang and X. Wang, "A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane," *Plant Physiology*, vol. 127, no. 3, pp. 1102–1112, 2001.
- [27] Y. Nishizuka, "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation," *Nature*, vol. 334, no. 6184, pp. 661–665, 1988.
- [28] M. S. Perin, V. A. Friedt, G. A. Mignery, R. Jahn, and T. C. Südhof, "Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C," *Nature*, vol. 345, no. 6272, pp. 260–263, 1990.
- [29] J. D. Clark, L.-L. Lin, R. W. Kriz et al., "A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP," *Cell*, vol. 65, no. 6, pp. 1043–1051, 1991.
- [30] E. A. Nalefski, L. A. Sultzman, D. M. Martin et al., "Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 27, pp. 18239–18249, 1994.
- [31] S. G. Rhee, "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, pp. 281–312, 2001.
- [32] E. A. Nalefski and J. J. Falke, "The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity," *Protein Science*, vol. 5, no. 12, pp. 2375–2390, 1996.
- [33] W. Cho and R. V. Stahelin, "Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1761, no. 8, pp. 838–849, 2006.
- [34] R. V. Stahelin and W. Cho, "Roles of calcium ions in the membrane binding of C2 domains," *The Biochemical Journal*, vol. 359, no. 3, pp. 679–685, 2001.
- [35] L. Zheng, R. Krishnamoorthi, M. Zolkiewski, and X. Wang, "Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β ," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 26, pp. 19700–19706, 2000.
- [36] K. Tiwari and G. Paliyath, "Cloning, expression and functional characterization of the C2 domain from tomato phospholipase D α ," *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 49, no. 1, pp. 18–32, 2011.
- [37] J. Zhao and X. Wang, "Arabidopsis Phospholipase D ϵ 1 Interacts with the Heterotrimeric G-protein α -Subunit through a Motif Analogous to the DRY Motif in G-protein-coupled Receptors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 3, pp. 1794–1800, 2004.
- [38] Y. Ben Ali, F. Carrière, and A. Abousalham, "High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)," *Protein Expression and Purification*, vol. 51, no. 2, pp. 162–169, 2007.
- [39] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [40] D. W. A. Buchan, F. Minneci, T. C. O. Nugent, K. Bryson, and D. T. Jones, "Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench," *Nucleic Acids Research*, vol. 41, pp. W349–W357, 2013.
- [41] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, and Y. Zhang, "The I-TASSER suite: protein structure and function prediction," *Nature Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 7–8, 2015.
- [42] M. A. Lomize, I. D. Pogozheva, H. Joo, H. I. Mosberg, and A. L. Lomize, "OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes," *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 1, pp. D370–D376, 2012.
- [43] R. Daly and M. T. W. Hearn, "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 18, no. 2, pp. 119–138, 2005.
- [44] I. Schöffner, K.-P. Rücknagel, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann, "Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 104, no. 2, pp. 79–87, 2002.
- [45] H. El Maarouf, F. Carrière, M. Rivière, and A. Abousalham, "Functional expression in insect cells, one-step, purification and characterization of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)," *Protein Engineering*, vol. 13, no. 11, pp. 811–817, 2000.
- [46] R. Schöps, A. Schierhorn, I. Schöffner, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann, "Identification of phospholipase D from cabbage as N-terminally acetylated PLD2," *Journal of Protein Chemistry*, vol. 21, no. 6, pp. 407–411, 2002.
- [47] A. Abousalham, M. Riviere, M. Teissere, and R. Verger, "Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage," *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol. 1158, no. 1, pp. 1–7, 1993.

- [48] A. Abousalham, M. Teissere, A. M. Gardies, R. Verger, and G. Noat, "Phospholipase D from soybean (*Glycine max* L.) suspension-cultured cells: purification, structural and enzymatic properties," *Plant and Cell Physiology*, vol. 36, no. 6, pp. 989–996, 1995.
- [49] H. Sato, T. Watanabe, Y. Sagane, Y. Nakazawa, and K. Takano, "Purification and characterization of phospholipase D from cabbage leaves," *Food Science and Technology Research*, vol. 6, no. 1, pp. 29–33, 2000.
- [50] R. Lambrecht and R. Ulbrich-Hofmann, "A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization," *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, vol. 373, no. 2, pp. 81–88, 1992.
- [51] R. Kornfeld and S. Kornfeld, "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 54, pp. 631–664, 1985.
- [52] L. Faye, V. Gomord, A. C. Fitchettelaine, and M. J. Chrispeels, "Affinity purification of antibodies specific for asn-linked glycans containing $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucose or $\beta 1 \rightarrow 2$ Xylose," *Analytical Biochemistry*, vol. 209, no. 1, pp. 104–108, 1993.
- [53] R. Strasser, "Plant protein glycosylation," *Glycobiology*, vol. 26, no. 9, pp. 926–939, 2016.
- [54] X. Wang, J. H. Dyer, and L. Zheng, "Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 306, no. 2, pp. 486–494, 1993.
- [55] J. Ueki, S. Morioka, T. Komari, and T. Kumashiro, "Purification and characterization of phospholipase D (PLD) from rice (*Oryza sativa* L.) and cloning of cDNA for PLD from rice and maize (*Zea mays* L.)," *Plant and Cell Physiology*, vol. 36, no. 5, pp. 903–914, 1995.
- [56] T. Watanabe, H. Sato, Y. Sagane, Y. Nakazawa, and K. Takano, "Primary structure of phospholipase D purified from cabbage leaves," *Seibutsu Butsuri Kagaku*, vol. 43, no. 3, pp. 159–164, 1999.
- [57] Z. Novotná, J. Káš, J. Daussant, J. Sajdok, and O. Valentová, "Purification and characterisation of rape seed phospholipase D," *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 37, no. 7-8, pp. 531–537, 1999.
- [58] Y. Nakazawa, H. Sato, M. Uchino, and K. Takano, "Purification, characterization and cloning of phospholipase D from peanut seeds," *Protein Journal*, vol. 25, no. 3, pp. 212–223, 2006.
- [59] I. Simões, E.-C. Mueller, A. Otto et al., "Molecular analysis of the interaction between cardosin A and phospholipase D α . Identification of RGD/KGE sequences as binding motifs for C2 domains," *The FEBS Journal*, vol. 272, no. 22, pp. 5786–5798, 2005.
- [60] N. Verdager, S. Corbalan-Garcia, W. F. Ochoa, I. Fita, and J. C. Gómez-Fernández, "Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C α directly to phosphatidylserine," *EMBO Journal*, vol. 18, no. 22, pp. 6329–6338, 1999.
- [61] K. Kuppe, A. Kerth, A. Blume, and R. Ulbrich-Hofmann, "Calcium-induced membrane microdomains trigger plant phospholipase D activity," *Chembiochem*, vol. 9, no. 17, pp. 2853–2859, 2008.
- [62] S. Majd, E. C. Yusko, J. Yang, D. Sept, and M. Mayer, "A model for the interfacial kinetics of phospholipase D activity on long-chain lipids," *Biophysical Journal*, vol. 105, no. 1, pp. 146–153, 2013.
- [63] A. Abousalham, J. Nari, M. Teissère, N. Ferté, G. Noat, and R. Verger, "Study of fatty acid specificity of sunflower phospholipase D using detergent/phospholipid micelles," *European Journal of Biochemistry*, vol. 248, no. 2, pp. 374–379, 1997.
- [64] O. Perisic, S. Fong, D. E. Lynch, M. Bycroft, and R. L. Williams, "Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 3, pp. 1596–1604, 1998.
- [65] M. Guerrero-Valero, C. Ferrer-Orta, J. Querol-Audí et al., "Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 16, pp. 6603–6607, 2009.
- [66] B. Ananthanarayanan, S. Das, S. G. Rhee, D. Murray, and W. Cho, "Membrane targeting of C2 domains of phospholipase C- δ isoforms," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 5, pp. 3568–3575, 2002.

Caractérisation biochimique des phospholipases D et de leurs domaines fonctionnels. Nouvelle méthode de mesure de l'activité phospholipase D.

La phospholipase D (PLD) hydrolyse les phospholipides membranaires en libérant leur tête polaire afin de générer l'acide phosphatidique (PA), impliqué dans la signalisation cellulaire. Pour comprendre les propriétés biochimiques des PLDs, les travaux présentés ont été réalisés autour de deux axes. Le premier axe concerne l'expression recombinante et la purification de la PLD α d'*Arabidopsis thaliana* (AtPLD α) dans la levure *Pichia pastoris*. La détermination de la séquence N-terminale a révélé que l'AtPLD α est amputée de ses 35 premiers résidus, suggérant ainsi la participation d'un mécanisme de maturation. Cependant, la région N-terminale des PLDs de plantes est homologue au domaine C2, impliqué dans leur interaction Ca²⁺-dépendante avec la membrane. Afin d'évaluer l'impact d'un tel clivage, les domaines C2 de l'AtPLD α mais également de l'AtPLD β , à titre de comparaison, ont été étudiés sous leur forme entière ou mature. Ainsi, la caractérisation de leur affinité pour les phospholipides, associée à leur modélisation tridimensionnelle, a permis de démontrer que les différences de régulation par le Ca²⁺, observées entre les formes entières et mature, provenaient de la présence d'une hélice α amphipathique, retirée lors du processus de maturation. Le second axe concerne le développement d'une nouvelle méthode de mesure des activités PLD *via* le dosage de manière direct, spécifique et continu du PA grâce à la propriété d'amplification de fluorescence par chélation de la 8-hydroxyquinoline, en présence de Ca²⁺. Ainsi, ce test apparaît adapté pour le suivi de l'inhibition des PLDs et pour l'étude de leur spécificité de substrat, en utilisant des phospholipides naturels avec différentes têtes polaires, et à l'échelle d'une microplaque.

Biochemical characterization of phospholipases D and their functional domains. Novel method for measuring phospholipase D activities.

Phospholipase D (PLD) hydrolyses membrane phospholipids, leading to the formation of a free polar headgroup and phosphatidic acid, involved in cell signaling. To understand the biochemical properties of PLDs, this work has been made around two axes. The first one concerns the recombinant expression and purification of the PLD α of *Arabidopsis thaliana* (AtPLD α) in the yeast *Pichia pastoris*. The N-terminal sequence of the recombinant AtPLD α has been determined and found to lack its first 35 amino acids, suggesting the involvement of a maturing mechanism. However, plant PLDs exhibit a C2-lipid binding domain at their N-terminal region, which is involved in their Ca²⁺-dependent membrane targeting. Thus, to assess the impact of such a cleavage, whole and mature-like C2 domains of AtPLD α , as well as of AtPLD β for the sake of comparison, were studied. Thus, the characterization of their affinity for phospholipids, combined with their three-dimensional modeling have demonstrated that the differences in their regulation by Ca²⁺, observed between whole and mature-like forms, originated from the presence of a N-terminus amphipathic α helix, removed during the maturation process. The second axis, concerns the development of a novel PLD assay that measure PA in a direct, specific and continuous manner, using the chelation enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline in the presence of Ca²⁺. Thus, this assay appears suitable to monitor both the inhibition of PLDs as well as their substrate specificity, using natural phospholipids with different polar headgroups, and at a microplate scale.