



HAL
open science

Caractérisation structurale et fonctionnelle des phospholipases D

Yani Arhab

► **To cite this version:**

Yani Arhab. Caractérisation structurale et fonctionnelle des phospholipases D. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1225 . tel-02056878

HAL Id: tel-02056878

<https://theses.hal.science/tel-02056878>

Submitted on 4 Mar 2019

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 : 2018LYSE1225

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 16/11/2018, par :

Yani ARHAB

Caractérisation structurale et fonctionnelle des phospholipases D

Devant le jury composé de :

MIELE Adriana Erica	Professeure Université Lyon1	Examinatrice
JOUHET Juliette	Chargée de recherche CNRS Université Grenoble Alpes	Rapporteuse
MEUNIER-GONTERO Brigitte	Directrice de recherche CNRS Aix Marseille Université	Rapporteuse
CHERRIER Mickaël V.	Maître de conférences Université Grenoble Alpes	Examineur
NOIRIEL Alexandre	Maître de conférences Université Lyon1	Co-encadrant de thèse
ABOUSALHAM Abdelkarim	Professeur Université Lyon1	Directeur de thèse

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire Métabolisme, Enzymes et Mécanismes Moléculaires (MEM²) à l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS-UMR5246 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'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

« Non, merci ! Non, merci ! Non, merci ! Mais... chanter,
Rêver, rire, passer, être seul, être libre,
Avoir l'œil qui regarde bien, la voix qui vibre,
Mettre, quand il vous plaît, son feutre de travers,
Pour un oui, pour un non, se battre, – ou faire un vers !
Travailler sans souci de gloire ou de fortune,
À tel voyage, auquel on pense, dans la lune !
N'écrire jamais rien qui de soi ne sortît,
Et modeste d'ailleurs, se dire : mon petit,
Sois satisfait des fleurs, des fruits, même des feuilles,
Si c'est dans ton jardin à toi que tu les cueilles !
Puis, s'il advient d'un peu triompher, par hasard,
Ne pas être obligé d'en rien rendre à César,
Vis-à-vis de soi-même en garder le mérite,
Bref, dédaignant d'être le lierre parasite,
Lors même qu'on n'est pas le chêne ou le tilleul,
Ne pas monter bien haut, peut-être, mais tout seul ! »

(Cyrano de Bergerac, II, 8 - Edmond Rostand 1868-1918)

« Le nouveau personnage qui va émerger, le nouvel archétype, c'est le chercheur [...]. C'est quelqu'un qui est dans la curiosité, dans l'ouverture d'esprit, qui est obligé de donner sans perdre et de prendre sans que les autres perdent. C'est une manière de satisfaire toujours ce désir d'avancer, de bouger, de changer qui est consubstantiel à l'âme humaine [...]. Le chercheur est une belle image de l'homme de demain, l'homme bienveillant capable de donner sans perdre ».

(Bernard Maris 1946-2015)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Brigitte Meunier-Gontero et le Dr. Juliette Jouhet pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche. Je les remercie pour leurs conseils dans l'amélioration de ce manuscrit. Je tiens également à remercier le Pr. Adriana Miele et le Dr. Mickaël Cherrier pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr. Abdelkarim Abousalham pour m'avoir accepté dans son équipe dès le master 1, puis pour m'avoir proposé ce sujet de recherche lors de mon master 2 recherche et de m'avoir accepté et soutenu pour poursuivre en thèse.

J'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance au Dr. Alexandre Noiriel pour m'avoir encadré avec patience et pédagogie au cours de ces quatre dernières années. J'admire sa rigueur d'analyse, sa capacité de travail et ses stratégies de recherches. Le Dr. Alexandre Noiriel et le Pr. Abdelkarim Abousalham ont été mes premiers formateurs en recherche scientifique, ils m'ont appris avec justesse à aborder un projet, à mettre au point un protocole d'expérimentation scientifique et à analyser des résultats. Leurs conseils ont toujours été bienveillants et leur sérieux, leur rigueur et honnêteté d'esprit a fait de ces années de recherches un véritable plaisir. J'ai beaucoup appris à leur contact et je souhaite ici leur adresser mes remerciements les plus sincères.

Je suis reconnaissant envers le Pr. René Buchet de m'avoir accepté eu sein de l'équipe ODMB (Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques) et le Pr. David Magne, directeur de l'équipe MEM² (Métabolisme, Enzymes et Mécanismes Moléculaires). Je souhaite remercier l'ensemble des membres de cette équipe de recherche pour leur expertise, leur gentillesse et leur bonne humeur. Pour être resté un peu plus tard le soir mais aussi pour avoir été arrangeants dans l'organisation de l'enseignement, pédagogues et toujours prêts à rendre service.

Cette thèse n'aurait pu se dérouler sans d'importantes collaborations, en premier lieu je souhaite remercier le Dr. Mickaël Cherrier qui a suivi dès les premiers jours mes travaux de purification et de structure. J'admire sa patience, sa pédagogie et sa disponibilité. Je citerai aussi pour leur aide au cours de ces travaux le Dr. Sébastien Violot, Arnaud Comte responsable de la chimiothèque de l'ICBMS et Alexandra Berlioz-Barbier pour la spectrométrie de masse. Je souhaite aussi remercier Yoann Pascal de l'équipe CO2GLYCO et Baptiste Fourmaux de l'IMBL. Enfin, je tiens à remercier les collègues de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS pour leur gentillesse, la disponibilité de leur matériel et de leurs locaux.

Tant de personnes m'ont assisté au cours de ces travaux et ont participé aux résultats de ces recherches. Je souhaite remercier les stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Thao Chu ainsi que Henry Zivkovic, et les stagiaires du laboratoire dont le travail valorise ces résultats : Pavlina Dubois, Mialitiana Solo Nomenjanahary, Coline Berthollier, ainsi que Houda Abla et Karim Bessa pour ce qu'ils ont accompli avec sérieux sur la partie inhibition de cette thèse, un travail remarquable.

Légitimement, je dois une reconnaissance toute particulière à mes collègues doctorants de la première heure, ils ont aiguillé mes premiers pas au laboratoire : Abdhallah Khatib, Meddy El Alaoui et Renaud Rahier, ainsi qu'à mes collègues de paillasse actuels : les ô combien uniques Ahlem Eddehech, Alaeddine El Jamal et Mathieu Borel. Enfin, je tiens à remercier mes collègues doctorant issu de la même promotion et partageant nos fortunes solitaires communes au cours d'illustres midis et soirées. Cette thèse aurait été plus difficile sans eux. Chloé Aymard, Léa Pourchet, Pierre Garcia ont été d'une aide scientifique et humaine inestimable durant toutes ces années. Merci les amis. Je tiens ici à remercier tout particulièrement Flora Peillard-Fiorente pour son aide, son soutien et ses conseils objectifs toujours avisés, mais aussi Séverine Rangama et Grégoire Bonnamour, tous trois universitaires et doctorants expatriés à qui j'exprime mon soutien beaucoup d'amitié, de solidarité et de courage.

Puis, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de volley-ball ASVEL8 pour leur amitié et leur confiance. Cela m'a permis d'évacuer les déceptions journalières. Il y règne, dans cette équipe, une amitié saine et sincère propice au plaisir et au dépassement sportif.

Unique fût mon expérience musicale au cours de cette thèse. Ainsi, Je tiens à remercier notamment le Brass Band Brassaventure, ses musiciens, ses présidents successifs et inlassables Pascal Fraisse et Mickael Giordano, ses directeurs musicaux Sylvain Elissonde et Serge Desautels. Le Brass Band est une passion et je les remercie de l'avoir alimentée et soutenue, de m'avoir fait confiance en me confiant la responsabilité de soliste. Je les en remercie infiniment, et aussi pour leur gentillesse et les moments uniques parfois au zénith de notre art que nous avons passé ensembles qui resteront gravés. Merci les amis, vivement, merci pour l'aventure.

Outre ces personnes, je souhaite aussi remercier Florent Bonnetain pour ses conseils utiles, tant musicaux que scientifiques. A travers lui je souhaite remercier tout

spécialement les membres du Lyon Métropole Orchestra et son président Jean-Marc Kasbarian pour m'avoir fait vivre des expériences musicales richissimes et uniques au sein même d'un pupitre d'une grande qualité humaine. Merci à Elisa Micieli, à Denis Gonin et à Fabien Cavoit. Je souhaite aussi remercier l'orchestre d'harmonie Heyrieux Musique et remercier en particulier Pierre Rousseau, Thomas Vitte et Magalie Rousseau-Lacroix. Il y a x projets encore à mener ensembles.

J'adresse à mon professeur de tuba, Vincent Ollier, ma reconnaissance pour m'avoir pris sous son aile dès le premier jour à l'ENM de Villeurbanne.

Je tiens, enfin, à remercier Marie Dernoncourt et Mathilde Rousselle pour leur courage à relire cette thèse. Merci aussi à deux grands amis, Marc Le Pape et Antoine Rémond, dont les discussions et réflexions ont émaillé ce travail. Leur amitié m'est extrêmement précieuse et je les remercie pour leur soutien.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes proches ainsi que mon grand frère pour leur soutien sans faille depuis le début de mes études.

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

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Table des matières

Liste des abréviations	18
Liste des figures	22
Liste des tableaux	26
Avant-propos	27
1. Introduction	29
1.1. Les lipides membranaires	31
1.1.1. Les glycérolipides	32
1.1.2. Les glycérophospholipides.....	32
1.1.3. Les sphingolipides	33
1.1.4. Les stérols	34
1.1.5. Géométrie des lipides.....	36
1.1.6. La compartimentation du vivant	37
1.1.7. La membrane cellulaire, une mosaïque fluide ?	38
1.2. Les lipases et phospholipases	40
1.2.1. Phospholipases A ₁	41
1.2.2. Phospholipases A ₂	42
1.2.3. Phospholipases B	43
1.2.4. Phospholipases C	44
1.2.5. Phospholipases D	44
1.3. État de la recherche sur la PLD	46
1.3.1. Historique.....	46
1.3.2. Le modèle de la PLD d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
1.3.3. La superfamille des PLD	52
1.3.3.1. Les PLD à motifs HKD	52
1.3.3.2. Les PLD sans motifs HKD.....	56
1.3.3.3. Mécanisme catalytique des PLD	57
1.3.3.4. Spécificité de substrat des PLD.....	60
1.3.3.5. Méthodes de mesure de l'activité PLD	60
1.3.3.5.1. Test colorimétrique.....	61
1.3.3.5.2. Test fluorimétrique	61
1.3.3.5.3. Autres tests.....	62
1.3.3.6. La structure des PLD	62
1.3.3.6.1. La relation structure-fonction	62
1.3.3.6.2. Méthodes de résolutions	64
1.3.3.6.2.1. Méthodes à haute résolution	64
1.3.3.6.2.2. Méthode à basse résolution.....	64
1.3.3.6.3. Structures résolues dans la superfamille de PLD	65
1.3.3.7. Cofacteurs des PLD.....	68
1.3.3.8. Rôles physiologiques de la PLD	68
1.3.3.8.1. Chez les végétaux	69
1.3.3.8.2. Chez la levure	70
1.3.3.8.3. Chez les mammifères.....	71
1.3.3.8.3.1. La PLD humaine	71
1.3.3.8.3.2. La PLD et le cancer.....	72
1.3.3.8.3.3. La PLD et la maladie de Parkinson.....	75
1.3.3.8.3.4. La PLD et la maladie d'Alzheimer	75

1.3.3.8.3.5. La PLD et la sclérose en plaques	76
1.3.3.8.3.6. La PLD et le cytosquelette	76
1.3.3.8.3.7. Autres pathologies impliquant la PLD.....	77
1.3.3.8.4. Chez les bactéries	79
1.3.3.8.5. Chez les virus.....	79
1.3.3.9. Inhibiteurs des PLD.....	80
1.3.3.10. Modulation de l'activité PLD par mutagenèse dirigée.....	84
1.4. Le métabolisme lipidique chez les algues	87
1.4.1. La PLD et la PC chez les algues	89
2. Matériel & méthodes.....	93
2.1. Expression recombinante de PLD végétales	95
2.1.1. Microbiologie.....	95
2.1.1.1. Souches bactériennes.....	95
2.1.1.1.1. <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	95
2.1.1.1.2. <i>Escherichia coli</i> BL21 CodonPlus (Stratagene).....	95
2.1.1.1.3. <i>Escherichia coli</i> DH5 α TM -T1R kit GENEART (Life Technologies)	96
2.1.1.1.4. <i>Escherichia coli</i> GM48	96
2.1.1.1.5. <i>Escherichia coli</i> JM109	96
2.1.1.1.6. Milieux et conditions de culture	96
2.1.1.1.7. Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	97
2.1.1.2. Souches de levure, milieux et conditions	97
2.1.1.2.1. <i>Pichia pastoris</i> X33	97
2.1.1.2.2. <i>Pichia pastoris</i> SMD1168	98
2.1.1.2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 062	98
2.1.1.2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKB 2239	98
2.1.1.2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKB 2079	98
2.1.1.2.6. Milieux et conditions de culture	98
2.1.1.2.7. Transformation de <i>Pichia pastoris</i>	99
2.1.1.2.8. Transformation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
2.1.2. Culture cellulaire.....	100
2.1.2.1. Cellules PC-3.....	100
2.1.2.2. Test de toxicité	100
2.1.2.3. Test de viabilité	101
2.1.3. Biologie moléculaire.....	101
2.1.3.1. ADN matrice	101
2.1.3.2. Plasmides.....	101
2.1.3.2.1. pET28b	101
2.1.3.2.2. pGAPZB	103
2.1.3.2.3. pYES2.....	103
2.1.3.2.4. pGM [®] -T Easy	104
2.1.3.2.5. pRS415	105
2.1.3.2.6. pME962	106
2.1.3.3. Purification des plasmides par midi préparation	107
2.1.3.4. Extraction des génomes de <i>Pichia pastoris</i>	107
2.1.3.5. Extraction des ARN de <i>Pichia pastoris</i>	107
2.1.3.6. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR).....	108
2.1.3.6.1. PCR.....	108
2.1.3.6.1.1. PCR chevauchante	109
2.1.3.6.1.2. PCR nichée.....	109

2.1.3.6.2. RT-PCR	110
2.1.3.6.3. qPCR.....	110
2.1.3.7. Clonage des ADNc.....	110
2.1.3.7.1. Clonages des gènes issus de mutagenèse dirigée	110
2.1.3.7.2. Clonage des domaines minimum.....	113
2.2. Analyse biochimique et structurale des PLDs	114
2.2.1. Bioinformatique	114
2.2.1.1. Recherche de séquences	114
2.2.1.2. Modélisation de structures protéiques	115
2.2.2. Lipidomique	115
2.2.2.1. Extractions des phospholipides de levure	116
2.2.2.2. Extraction des triglycérides	116
2.2.2.3. Quantification des lipides	117
2.2.3. Purification de protéines	117
2.2.3.1. Extraction des enzymes	117
2.2.3.2. PLD de <i>Vigna unguiculata</i>	118
2.2.3.2.1. Chromatographie sur colonne d'Octyl-Sépharose®	118
2.2.3.2.2. Chromatographie par filtration sur gel	118
2.2.3.3. PLD d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	118
2.2.3.4. Concentration de la protéine.....	119
2.2.3.5. Dosage de protéines.....	119
2.2.4. Mesure de l'activité enzymatique	120
2.2.4.1. Test chromogénique	120
2.2.4.2. Tests fluorescents	121
2.2.4.2.1. Dosage de la choline.....	121
2.2.4.2.2. Dosage du PA	121
2.2.4.2.3. Criblage d'inhibiteurs	121
2.2.5. Analyse des protéines par SDS-PAGE	122
2.2.6. Transfert des protéines sur membrane et révélation par immunoempreinte.....	122
2.3. Outils d'analyse structurale	123
2.3.1. SEC/MALS	123
2.3.2. Cristallographie.....	124
2.3.2.1. Principe.....	124
2.3.2.2. Criblage de conditions de cristallisations	126
2.3.3. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	127
3. Résultats & discussion	129
3.1. Chapitre 1 : Analyse théorique et expérimentale de la relation structure-fonction des phospholipases D végétales	131
3.1.1. Mutagenèse dirigée de la PLD d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	133
3.1.1.1. Criblage <i>in silico</i> des PLD végétales	135
3.1.1.2. Rationalité des mutants construits	142
3.1.1.3. Activité catalytique des mutants	147
3.1.1.3.1. Mutations des résidus catalytiques "HXKX ₄ D"	148
3.1.1.3.2. Motif "HHXKX ₄ DX ₈ S"	148
3.1.1.3.3. Motif "YXHXXKX ₂ IXDDX ₆ GSANXNX ₂ RSM"	149
3.1.1.3.4. Motif "LLKKK", "PREPWHDIH", "FIYIENQYFKG" et "FTVYVVV" ..	149
3.1.1.3.5. Motif "PPILTT"	150
3.1.1.3.6. Mutations aléatoires	150
3.1.1.4. Expression des protéines mutées	150

3.1.1.5. Discussion	154
3.1.1.6. Conclusions & perspectives	156
3.1.2. Analyse structurale de la PLD de <i>Vigna unguiculata</i>	157
3.1.2.1. Intérêt d'une structure 3D	157
3.1.2.2. Étude structurale expérimentale de la PLD	158
3.1.2.2.1. Purification de la <i>Vu</i> PLD	159
3.1.2.2.2. SEC/MALS	162
3.1.2.2.3. Criblage de conditions de cristallogenèse	164
3.1.2.2.3.1. Premier criblage	165
3.1.2.2.3.2. Deuxième criblage	167
3.1.2.2.3.3. Troisième criblage	169
3.1.2.2.3.4. Quatrième criblage	170
3.1.2.2.3.5. Cinquième criblage	171
3.1.2.2.4. Analyse des cristaux de <i>Vu</i> PLD	172
3.1.2.2.5. Analyse structurale par SAXS et modèle à basse résolution	174
3.1.2.2.6. Discussion	178
3.1.2.2.7. Conclusions & perspectives	180
3.1.2.3. Étude structurale <i>in silico</i> de la PLD	182
3.1.2.3.1. Analyse de la structure primaire	182
3.1.2.3.2. Analyse de la structure secondaire	184
3.1.2.3.3. Quel modèle pour construire par homologie ?	188
3.1.2.3.4. Proposition d'un modèle 3D de l' <i>At</i> PLD	190
3.1.2.3.5. Conclusions & perspectives	192
3.2. Chapitre 2 : Domaine catalytique minimal, maturation post-traductionnelle et inhibition de la PLD	195
3.2.1. Le domaine catalytique minimal de la PLD d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	197
3.2.1.1. De l'utilité d'exprimer le domaine minimum d'une enzyme	197
3.2.1.2. Rationalité des domaines construits	199
3.2.1.3. Construction des domaines minimums de la PLD par PCR	200
3.2.1.4. Activité catalytique des domaines minimums et expression	202
3.2.1.5. Le cas du NΔ70	204
3.2.1.6. Discussion	204
3.2.1.7. Conclusions & perspectives	205
3.2.2. Étude de la partie amino-terminale de la PLD d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	206
3.2.2.1. État de l'art	207
3.2.2.2. Expression de l' <i>At</i> PLD avec une étiquette 6xHis	212
3.2.2.2.1. Clonage dans <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> et <i>P. pastoris</i>	213
3.2.2.2.2. Activité enzymatique et expression	213
3.2.2.2.3. Test de la souche <i>pep4</i> SMD1168	218
3.2.2.3. Mutagenèse dirigée du site de clivage	220
3.2.2.3.1. Construction des mutants avec une étiquette 6xHis	221
3.2.2.3.2. Activité catalytique, purification et expression des mutants	222
3.2.2.4. Discussion	225
3.2.2.5. Conclusions & perspectives	226
3.2.3. Criblage, identification et caractérisation d'un nouvel inhibiteurs des PLDs	228
3.2.3.1. Les inhibiteurs connus et leur effet sur la PLD végétale	229
3.2.3.1.1. Les inhibiteurs universels	229
3.2.3.1.2. Les inhibiteurs des PLD végétales	230
3.2.3.1.3. Les inhibiteurs de la PLD humaine	231

3.2.3.2. Criblage de la chimiothèque de l'ICBMS.....	232
3.2.3.2.1. Méthodologie de criblage.....	232
3.2.3.2.2. Caractérisation de KBY7.....	234
3.2.3.2.3. Effet de l'inhibiteur KBY7 sur l'activité enzymatique des PLDs humaines	235
3.2.3.2.4. Analyse du KBY7 par spectrométrie de masse.....	236
3.2.3.3. Discussions.....	239
3.2.3.4. Conclusions & perspectives.....	242
3.3. Chapitre 3 : La PLD dans un contexte métabolique.....	245
3.3.1. Clonage et caractérisation biochimique d'une PLD de microalgue verte.....	247
3.3.1.1. Analyse in silico de la PLD de <i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	247
3.3.1.2. Clonage et expression de CsPLD.....	248
3.3.1.2.1. Analyse de l'ARN messager.....	249
3.3.1.2.2. Clonage de la CsPLD dans le plasmide pGAPZB.....	250
3.3.1.2.3. Clonage de la CsPLD dans le plasmide pEt28b.....	255
3.3.1.2.4. Expression de CsPLD.....	255
3.3.1.3. Discussion.....	256
3.3.1.4. Conclusions & Perspectives.....	258
3.3.2. Détecter et cribler l'activité PLD <i>in vivo</i>	258
3.3.2.1. Activité des PLD recombinantes, caractérisation de l'impact sur le lipidome de levure.....	259
3.3.2.2. Mise au point d'un test de criblage simple de l'activité PLD <i>in vivo</i>	264
3.3.2.3. La PLD SPO14 chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	265
3.3.2.3.1. Le rôle de SPO14.....	265
3.3.2.3.2. Impact de la délétion du gène <i>spo14</i> et de l'expression d'une PLD recombinante en levure.....	267
3.3.2.3.3. Criblage de l'activité PLD en présence du lipide C16:0 PAF.....	269
3.3.2.3.4. Test de complémentation avec la PLD d' <i>A. thaliana</i>	270
3.3.2.4. Conclusion & perspectives.....	271
4. Conclusion générale & perspectives.....	273
5. Références bibliographiques.....	283
Annexes.....	309

Liste des abréviations

3D : tridimensionnel

8-HQ : 8-hydroxyquinoléine

ABA : acide abscissique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

adPLA₂ : PLA₂ adypocytaire

*Ah*PLD : *Arachis hypogaea* PLD

ATGL : Adipocyte Triglycéride Lipase

*At*PLD : *Arabidopsis thaliana* PLD

ATX : Autotaxine

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : Acide ribonucléique interférents

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

*Bo*PLD : *Brassica oleracea* PLD

BSA : albumine de serum bovin

CBR : *calcium binding region*

CCM : Chromatographie sur couche mince

CGI-58 : *Comparative-Gene-Identification 58*

CL : cardiolipine

CR : *conserved region*

cPLA₂ : PLA₂ cytosolique

*Cs*PLD : PLD de *Coccomyxa subellipsoidea*

Da : dalton

DG : diacylglycérol

DGDG : Digalactosyl-DG

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

Domaine C2 : *Ca²⁺-lipid binding region*

Domaine PX : domaine d'homologie à phox

Domaine PH : domaine d'homologie à la plekstrine

ECL : *Enhanced Chemical Luminescence*

EDTA : Acide éthylène-diamine tétraacétique

FIPI : 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopémide

G3P : glycérol-3-phosphate

IP₃ : inositol-1,4,5-trisphosphate

iPLA₂ : PLA₂ calcium-indépendante

IPTG : Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside

LB : *Lysogeny Broth*

LC/MS/MC : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LDH : lactate deshydrogénase

LgPLD : *Loxosceles gaucho* PLD

Lp-PLA₂ : PLA₂ associée aux lipoprotéines

MGDG : monogalactosyl-DG

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

NBD : 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole

NAE : N-acyléthanolamine

NAPE : N-acyl-PE

Ni-IDA : *Ni²⁺-iminodiacetic acid*

Ni-TED : Ni²⁺-tris(carboxyméthyl)éthylène diamine

PA : acide phosphatidique

PAF: *Platelet Activating Factor*

PAF-AH : PAF acylhydrolase

Pb : paire de bases

PBS : *phosphate buffer saline*

PC : phosphatidylcholine

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PDB : *protein data bank*

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : polyéthylène glycol

PG : phosphatidylglycérol

pGAP : promoteur de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

PI : phosphatidylinositol

PI-3,4,5-P₃ ou IP₃: phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

PI-4,5-P₂ ou PIP₂: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIPES : *piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)*

PLA₁ : Phospholipase A₁

PLA₂ : Phospholipase A₂

PLB : Phospholipase B

PLC : Phospholipase C

PLD : phospholipase D

POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

PS : phosphatidylsérine

Rg : rayon de gyration

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAXS: *Small Angle X-ray Scattering*

ScPLD : *Streptomyces chromofuscus* PLD

SDS : dodécyl sulfate de sodium

SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

SEC/MALS : *Size Exclusion Chromatography/Multi Angle Light Scattering*

SM : sphingomyéline

sn : *stereospecific numbering*

sPLA₂ : PLA₂ sécrétée

TBST : Tris-buffered saline-Tween

TG : triglycérine ou triacylglycérol

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

TEMED : tétraméthyléthylènediamine

UV : Ultra-violet

*Vu*PLD : *Vigna unguiculata* PLD

YNB : *Yeast Nitrogen Base*

YPG : *Yeast Peptone* Glucose

wt : *wild-type*, type sauvage

Liste des figures

Figure 1 : Les différents lipides constituant des membranes cellulaires.	35
Figure 2 : Différentes géométries des lipides.	36
Figure 3 : Formation de structures lipidiques spontanées séparant une phase hydrophobe d'une phase hydrophile.	38
Figure 4. Action d'hydrolyse des différentes phospholipases sur la PC	41
Figure 5 : Action catalytique d'hydrolyse et de transphosphatidylatation de la PLD.....	45
Figure 6 : Site d'action des lécithinases A, B, C et D (Hanahan, 1947).	47
Figure 7 : Représentation schématique des différents domaines décrits sur la structure primaire du cœur catalytique des PLD et proposition d'une terminologie pour la description de ces travaux de thèse.	49
Figure 8 : Représentation schématique des domaines présents dans les PLD de bactérie (<i>Streptomyces antibioticus</i>), de plante (<i>Arabidopsis thaliana</i>), de levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), de mammifère (<i>Homo sapiens</i>) et dans l'endonucléase Nuc.	53
Figure 9 : Alignement des PLD de mammifère, de plante, de levure et de bactérie autour des quatre régions consensus décrites par Ponting & Kerr (Ponting and Kerr, 1996). .	54
Figure 10 : Moyenne des pourcentages d'identité de séquence entre les différents CR	55
Figure 11 : Mécanisme réactionnel de type « ping-pong » de la PLD.....	57
Figure 12 : Mécanisme catalytique des PLD.	58
Figure 13 : Structures des membres de la superfamille des PLD.....	67
Figure 14 : Modèle SAXS de la PLD α 2 de chou.	67
Figure 15 : Voies métaboliques activées par l'action de la PLD chez les mammifères.	73
Figure 16 : Halopémide et les principaux dérivés, inhibiteurs des PLD1 et/ou 2 humaines....	84
Figure 17 : Voies générales de synthèse de la PC.....	92
Figure 18 : Schéma du mécanisme de répression et d'induction de l'expression d'un gène cloné dans le plasmide pEt28b.	102
Figure 19 : Principe de la sélection d'un insert cloné dans le vecteur pGM [®] -T Easy.	105
Figure 20 : Représentation schématique des plasmides utilisés.....	106
Figure 21 : Principe de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) (d'après (Svergun and Koch, 2003)).	128
Figure 22 : Relation phylogénétique et diversité des PLD α végétales.....	139

Figure 23 : Conservation des résidus au sein des PLD α végétales.	140
Figure 24 : Positionnement des mutations de l'AtPLD α	143
Figure 25 : Représentation structurale des D stabilisant le H catalytique.....	145
Figure 26 : Mesure de l'activité catalytique des mutants de l'AtPLD et de leur expression.	148
Figure 27 : Révélation par immunoempreinte après SDS-PAGE (10 %) des mutants de PLD des clones n°2 et 3 exprimés dans dans <i>P. pastoris</i>	151
Figure 28 : Expression relative des ARNm codant la PLD dans les constructions où la protéine n'est pas détectée par immunoempreinte.	152
Figure 29 : Comparaison de l'activité totale d'un extrait brut de <i>P. pastoris</i> exprimant AtPLD et VuPLD.	158
Figure 30 : Chromatogramme de purification de la VuPLD sur Octyl Sépharose®.....	160
Figure 31 : Profil SEC/MALS de la VuPLD.....	163
Figure 32 : Chromatographie par filtration sur gel.	165
Figure 33 : Criblage de conditions de cristallogenèses, boîte 1.	166
Figure 34 : Cristaux de VuPLD, premier criblage.....	167
Figure 35 : Criblage des conditions de cristallogenèses, boîte 2, 3 et 4.....	168
Figure 36 : Cristaux de VuPLD, second criblage.	169
Figure 37 : Criblage des conditions de cristallogenèses, boîtes 5 et 6.	170
Figure 38 : Précipités cristallins de VuPLD obtenus au cours du quatrième criblage.	171
Figure 39 : Criblage de conditions de cristallogenèses, Boîtes 7, 8, 9 et 10.....	172
Figure 40 : Analyse de la diffraction aux rayons X.	173
Figure 41 : Schéma de la maille des cristaux de VuPLD.	174
Figure 42: Analyse structurale de VuPLD par SAXS.	175
Figure 43 : Modèles calculés à partir des données SAXS.....	176
Figure 44 : Analyse structurale de VuPLD par SAXS en présence de Ca ²⁺	177
Figure 45 : Courbe de Kratky des données de SAXS en présence de 0 à 20 mM de Ca ²⁺	178
Figure 46 : Représentation des domaines dupliqués dans l'AtPLD α	183
Figure 47 : Alignement des séquences des deux lobes de l'AtPLD α	184
Figure 48 : Prédiction des structures secondaires des lobes du côté N-terminal et C-terminal d'AtPLD.	185
Figure 49 : Alignement des deux lobes L1 et L2 de l'AtPLD et prédiction des structures secondaires communes.	187
Figure 50 : Topologie schématique proposée pour un lobe de l'AtPLD α	188

Figure 51 : Modélisation de l'AtPLD entière par les deux serveurs Phyre2 et I-TASSER.....	189
Figure 52 : Modèles de l'AtPLD α sans son domaine C2.	191
Figure 53 : Proposition de repliement général d'un des deux lobes du cœur catalytique des PLD.	192
Figure 54 : Position relative des mutants de l'AtPLD dans un modèle topologique du repliement 3D de l'enzyme.	193
Figure 55 : Séquence peptidique du domaine C2 de la PLD d' <i>A. thaliana</i> et représentation schématique des structures secondaires (Rahier et al., 2016a).	199
Figure 56 : Représentation schématique des domaines minimums d'AtPLD construits par délétions successives de l'extrémité N-terminale.	200
Figure 57 : Représentation schématique de la construction des domaines minimums de l'AtPLD	202
Figure 58 : Activité enzymatique totale rapporté à 100 % du N Δ 0 et expression des domaines minimums dans la levure <i>P. pastoris</i>	203
Figure 59 : Proposition d'étude des domaines minimums de la PLD végétale.....	206
Figure 60 : Analyse par SDS-PAGE des fractions éluées de la purification la VuPLD exprimée dans <i>P. pastoris</i> sur colonne d'Octyl Sépharose [®]	209
Figure 61 : Stratégie de clonage de l'AtPLD avec une étiquette 6xHis à l'extrémité N- terminale.....	213
Figure 62 : Mesure de l'activité enzymatique et détection de la PLD exprimée dans des extraits cellulaires de <i>S. cerevisiae</i> par immunoempreinte.	214
Figure 63 : Mesure de l'activité PLD dans les cellules d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par la construction Nt-(His) ₆ AtPLD α et analyse par SDS-PAGE des protéines totales après induction à l'IPTG.	215
Figure 64 : Activité enzymatique et détection de la Nt-(His) ₆ AtPLD α dans la levure <i>P.</i> <i>pastoris</i> par immunoempreinte.....	215
Figure 65 : Schéma de la stratégie d'identification et de purification de la Nt-(His) ₆ AtPLD α	217
Figure 66 : Analyse par SDS-PAGE (10 %) de la purification de Nt-(His) ₆ AtPLD α par chromatographie d'affinité aux ions métalliques immobilisés.....	219
Figure 67 : Activité PLD relative (%) des fractions de purification de la Nt-(His) ₆ AtPLD α sur Ni-IDA.	220
Figure 68 : Schéma de la construction de l'AtPLD α sans son propeptide.	222

Figure 69 : Activité PLD relative (%) des constructions étiquetées (His) ₆	223
Figure 70 : Révélation par immunoempreinte des fractions issues de la purification sur Ni-IDA dans le tampon de lyse Tris/NaCl/Sucrose.....	225
Figure 71 : Proposition de construction d'une PLD 6xHis	227
Figure 72 : Activité de la <i>Vu</i> PLD en présence de phosphate, de vanadate et de ses dérivés.	230
Figure 73 : Effets des inhibiteurs de PLD végétale connus sur <i>Vu</i> PLD.	231
Figure 74 : Activité relative de la <i>Vu</i> PLD en présence des inhibiteurs connus des PLD1 et 2 humaines.....	231
Figure 75 : Déroulement du criblage d'inhibiteur.....	233
Figure 76 : Caractérisation de l'inhibiteur KBY7.....	234
Figure 77 : Effet de l'inhibiteur KBY7 sur l'activité enzymatique de différentes PLD.	235
Figure 78 : Effet de la molécule KBY7 sur l'activité PLD humaine de cellules cancéreuses prostatiques.....	236
Figure 79 : Analyse par spectrométrie de masse des deux lots de composé KBY7.	237
Figure 80 : Chromatogramme de séparation du composé KBY7 sur colonne Biphényle.	239
Figure 81 : Alignement des séquences protéiques de <i>Cs</i> PLD et d' <i>At</i> PLD.	248
Figure 82 : Alignement des séquences protéiques de <i>Cs</i> PLD (théorique et expérimentale) et d' <i>At</i> PLD.	250
Figure 83 : Représentation schématique du clonage de la <i>Cs</i> PLD dans le vecteur pGAPZB.	252
Figure 84 : Correction des mutations introduites par PCR au cours du clonage de la <i>Cs</i> PLD.	254
Figure 85 : Dosage des phospholipides dans les souches de <i>P. pastoris</i> exprimant une PLD recombinante.	261
Figure 86 : Voies de synthèse des TGs chez les levures.....	263
Figure 87 : Représentation schématique du PAF.....	267
Figure 88 : Cinétique de croissance comparative entre les différentes souches de <i>S. cerevisiae</i> avec et sans SPO14 et <i>P. pastoris</i> exprimant ou non une PLD recombinante.....	268
Figure 89 : Etude du phénotype de la souche sauvage et de la souche <i>spo14</i> ^{-/-} en présence de C16:0 PAF.....	269
Figure 90 : Test de Complémentation de la souche YKB 2079 Δ spo14 par la PLD d' <i>A. thaliana</i>	270

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structures résolues des phospholipases D.....	66
Tableau 2 : Liste des amorces utilisées.	111
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour la construction et le séquençage des domaines minimums et de l'ATpLD fusionnée à une étiquette (His) ₆	114
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés	123
Tableau 5 : Purifications de VuPLD	161
Tableau 6 : Liste des PLD α purifiées avec leur séquence N-terminale.	210
Tableau 7 : Séquences obtenues à l'issu du criblage des PLD α	311

Avant-propos

La biochimie est la science qui étudie la chimie du vivant, c'est-à-dire la formation, la structure, l'interaction et les modifications des macromolécules au sein d'organismes vivants. On classe les macromolécules en quatre familles : les sucres, les acides nucléiques (ADN et ARN), les protéines (dont les enzymes) et les lipides.

Les lipides tiennent leur particularité de leur caractère amphiphile ce qui leur permet de s'organiser en bicouche lipidique, première barrière de la cellule face au milieu extérieur.

Les membranes cellulaires sont donc la première frontière du vivant qui permet de séparer l'environnement extracellulaire de l'environnement intracellulaire où ont lieu les réactions chimiques. Les membranes contiennent aussi nombre de protéines qui permettent les échanges au travers de celles-ci et participent à l'organisation de la cellule.

La phospholipase D (PLD) est une enzyme lipolytique centrale dans le métabolisme et l'homéostasie cellulaire. Elle agit au niveau des membranes cellulaires entraînant leur modification et participant à leur plasticité.

La modification de cette frontière membranaire par les enzymes lipolytiques est d'évidence soumise à une régulation rigoureuse. Ainsi la modification de l'expression, la modification de sa localisation ou un bouleversement des modifications post-traductionnelles sont à la base d'importantes pathologies chez les mammifères. Ainsi la PLD est impliquée dans des pathologies comme les cancers, la maladie d'Alzheimer ou encore la sclérose en plaque. Pathologies qui n'ont pas, à l'heure actuelle, de traitement curatifs disponibles.

Si les rôles de la PLD sont décrits au sein des organismes vivants, peu de moyens efficaces ont été mis en œuvre jusqu'à présent pour favoriser sa régulation et ainsi traiter les maladies issues de cette dérégulation.

Ainsi les travaux de thèse présentés ci-après s'attachent à comprendre les relations structure-fonction de ces enzymes lipolytiques chez les végétaux avec un prisme permettant d'extrapoler les résultats aux PLD de mammifères et aux autres PLD du vivant.

Ces travaux de thèse seront décrits en trois parties majeures. Au cours de la première partie nous détaillerons nos recherches permettant d'identifier le rôle des résidus les plus conservés dans les PLD végétales avec une optique transposable aux PLD de mammifères. Dans le même esprit nous chercherons à positionner ces résidus au sein d'une structure tridimensionnelle (3D) et ainsi offrir un outil supplémentaire pour comprendre le mécanisme et la dynamique des PLD.

Dans une seconde partie, nous développerons une approche *in vitro* nous permettant d'étudier l'activité enzymatique des PLD à travers, tout d'abord, une approche fondamentale et l'analyse du domaine minimum et de la maturation de l'enzyme, puis une approche plus appliquée avec le criblage et la caractérisation d'un inhibiteur spécifique des PLD.

Enfin, après ces deux parties proposant une approche biochimique *ex vivo* fondamentale, une troisième partie nous permettra de reconsidérer l'enzyme dans un métabolisme et ainsi mesurer, quantifier, évaluer et apprécier son rôle et son impact dans un organisme vivant. Ceci se déroule avec le clonage d'une nouvelle PLD issue d'un organisme dont le métabolisme est tourné vers la synthèse de lipides et avec la caractérisation de la PLD de levure, et la mise au point d'une méthode de criblage de l'activité PLD *in vivo*.

Ainsi, ces travaux ambitionnent de mieux comprendre la structure mais aussi la fonction des PLD eucaryotes.

1. Introduction

1.1. Les lipides membranaires

Les lipides regroupent une large variété de composés qui se distinguent des autres composants de la matière vivante (sucres, protéines et acides nucléiques) par leur insolubilité dans l'eau. Cette propriété physicochimique particulière fait que l'on parle d'un milieu hétérogène quand on décrit la présence de lipides dans un milieu aqueux. Par opposition aux composés hydrophiles et solubles dans l'eau, les lipides sont des composés de nature hydrophobes et solubles dans les solvants organiques (éther, chloroforme ou benzène).

Les lipides ont quatre grandes fonctions dans le vivant :

- Les lipides servent au stockage de l'énergie principalement sous forme d'esters de glycérol (monoacylglycérol, diacylglycérol et triacylglycérol) ou de stérols dans les gouttelettes lipidiques. Ces réservoirs sont aussi de véritables ressources de lipides pour la biogenèse des membranes.
- Les membranes cellulaires sont composées de lipides amphiphiles qui combinent une portion hydrophobe et une portion hydrophile. La portion hydrophobe est susceptible de s'associer à d'autres groupements hydrophobes, il en est de même avec les groupements hydrophiles. Ainsi, les lipides vont former spontanément une bicouche lipidique.
- Les lipides peuvent servir de seconds messagers cellulaires. En effet ils se situent à la frontière entre l'extérieur et l'intérieur d'une cellule et peuvent donc participer à la transduction du signal à travers la membrane cellulaire. Leur dégradation peut mener les groupements polaires, solubles dans le cytosol, à se propager dans la cellule.
- Les lipides sont organisés au sein de la bicouche lipidique et forment des domaines spécifiques en termes de propriétés de surface, de charge et d'encombrement stérique permettant l'interaction avec des protéines ou des composés extracellulaires (Van Meer et al., 2008).

Au regard de la nomenclature internationale (Fahy et al., 2005), les lipides sont classés en huit catégories :

- les glycérophospholipides ;
- les glycérolipides ;
- les sphingolipides ;
- les stérols ;

- les acides gras ;
- les pré-nols ;
- les saccharolipides ;
- les polycétides.

Nous décrirons ici les composants majoritaires au sein des membranes biologiques et les éléments relatifs aux travaux décrits dans cette thèse.

Tous les lipides décrits sont représentés en Figure 1.

1.1.1. Les glycérolipides

Les glycérolipides comprennent tous les lipides contenant du glycérol. Ainsi, on distingue trois classes de glycérolipides : les acylglycérols, les glycéroglycolipides et les glycérophospholipides. Ces derniers sont souvent considérés comme une classe de lipide à part entière en raison de leur abondance et de leur importance dans la constitution des membranes, le métabolisme et la signalisation moléculaire.

Les acylglycérols sont des molécules de glycérols mono-, di- ou tri-substitués par l'estérification d'un acide gras (Figure 1).

Les glycéroglycolipides (ou glycolipides voire encore galactolipides) sont composés d'un *sn*-1,2-diacylglycérol (DG) lié en position *sn*-3 via une liaison osidique à un ou deux galactoses formant ainsi un monogalactosyl-DG (MGDG) ou digalactosyl-DG (DGDG) (Figure 1). Les glycolipides sont principalement retrouvés dans les membranes des thylakoïdes et sont donc particulièrement abondant chez les végétaux comme les algues (Weatherby and Carter, 2013).

1.1.2. Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides ou phospholipides sont les composants majeurs des membranes biologiques. Ce sont des espèces amphiphiles qui comprennent une portion hydrophobe formée par deux acides gras saturés ou insaturés et de longueur de chaîne variable estérifiés sur les fonctions alcools des carbones *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol. Ils sont caractérisés par la présence d'un groupement phosphate estérifié sur la fonction alcool du carbone *sn*-3 du glycérol. Les phospholipides sont aussi composés d'une portion hydrophile formée par un groupement ou tête polaire variable estérifiée sur le groupement phosphate. Le groupement phosphate réalise ainsi une liaison qualifiée de phosphodiester entre le carbone *sn*-3 du glycérol et le groupement polaire (choline, éthanolamine, glycérol, sérine ou inositol) (Figure 1).

Les glycérophospholipides sont nommés par rapport à la nature du groupement polaire : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylsérine (PS) ou phosphatidylinositol (PI). De son côté, l'acide phosphatidique (PA) est un phospholipide sans tête polaire. Dans les membranes eucaryotes la PC est le phospholipide majoritaire à plus de 50 %.

La cardiolipine (CL) est un diphosphatidyl glycérol, soit une molécule de glycérol estérifiée sur les fonctions alcools primaires du glycérol par deux groupements PA (Figure 1) et qui est principalement situées dans la membrane interne des mitochondries.

1.1.3. Les sphingolipides

Les sphingolipides constituent une autre classe de lipides membranaires composés d'une molécule de sphingosine, un alcool aminé à longue chaîne insaturée. Le groupement amine de la sphingosine peut être lié à un acide gras par une liaison amide formant ainsi le céramide (N-acyl-sphingosine). Le représentant majoritaire de cette classe est la sphingomyéline (SM) qui correspond à un céramide sur lequel est estérifié un groupement phosphocholine (Figure 1).

Une portion des sphingolipides appartient à la classe des glycolipides (sphingoglycolipides). Au lieu de porter un groupement phosphocholine sur un céramide ceux-ci portent une chaîne sucrée de mono-, di- ou oligosaccharides *via* une liaison osidique avec le C1 de l'ose formant ainsi le glucosylcéramide, galactosylcéramide (Figure 1) ou l'oligoglycosylcéramide.

On trouve aussi dans cette sous-classe les sphingoglycolipides sulfates pour lesquels un acide sulfonique est fixé sur le C3 d'un galactopyranosyl porté par un céramide comme le mono sulfo galactosylcéramide (Figure 1).

Les lipides sont des molécules susceptibles de subir des modifications de la part des enzymes lipolytiques formant ainsi des sous-produits lipidiques réactifs. Le clivage d'un phospholipide permet la libération d'un acide gras et d'un groupement lyso-phosphatidyl comme le lyso-PA, le lyso-PC, le sphingosylphosphorylcholine ou encore la sphingosine qui peut être phosphorylée en sphingosine-1-phosphate. Ces molécules vont notamment participer à la signalisation à travers des récepteurs membranaires. Un second type de clivage permet la libération du groupement polaire estérifié sur le phosphate, ou du groupement polaire phosphorylé estérifié sur la fonction alcool du carbone *sn*-3 du glycérol. Ceci génère du PA, du DG, du céramide-1-phosphate ou du céramide dont la fonction est alors de recruter des protéines cytosoliques à la membrane. Par ailleurs, certains lipides peuvent subir des

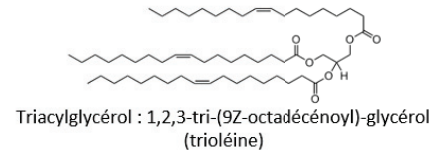
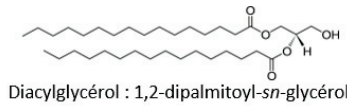
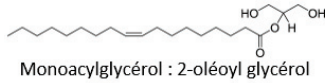
modifications chimiques comme le PI qui peut être phosphorylé à plusieurs reprises pour former du PI-4,5-bisphosphate (PI-4,5-P₂) ou PI-3,4,5-trisphosphate (PI-3,4,5-P₃), deux espèces hautement réactives qui régulent l'activité de nombreuses protéines (Van Meer et al., 2008).

1.1.4. Les stérols

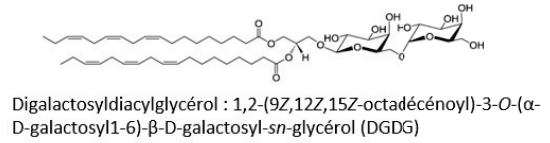
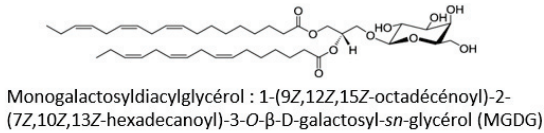
Les stérols sont des lipides très apolaires composés d'un groupement alkyl sur un noyau stérane (molécule composée de trois cycles à six atomes et un cycle à cinq atomes) hydroxylé sur lequel il est possible d'estérifier un acide gras. Le cholestérol est le stérol majoritaire chez les mammifères tandis que l'on trouve principalement l'ergostérol chez les levures et le sitostérol, le campestérol et le stigmastérol chez les végétaux (Figure 1).

Comme tous les lipides le cholestérol est partie prenante de la structure des membranes cellulaires. Cependant, sa biochimie est très particulière et très différente des autres lipides puisque son groupement polaire est extrêmement réduit : il ne s'agit que d'un groupement hydroxyle, comparé au groupement apolaire plus important (Fahy et al., 2005).

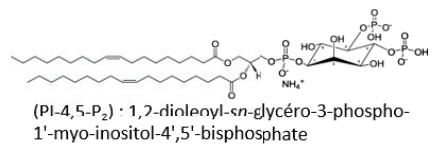
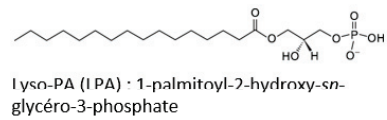
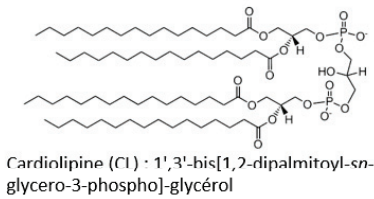
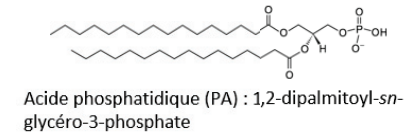
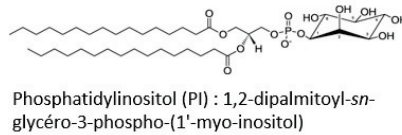
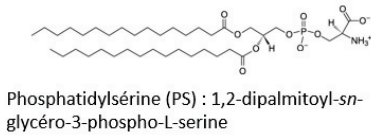
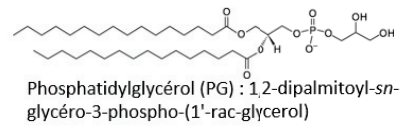
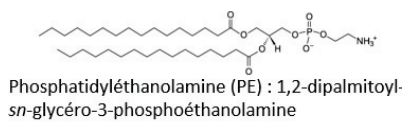
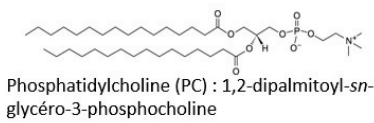
Acylglycérols



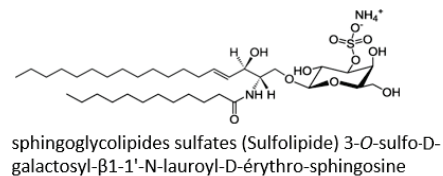
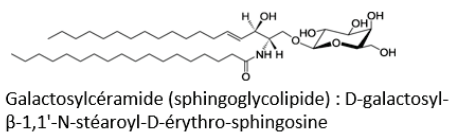
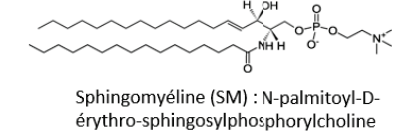
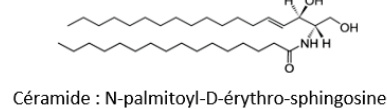
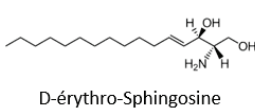
Glycolipides



Glycérophospholipides



Sphingolipides



Stérols

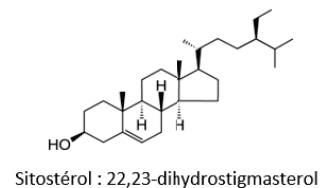
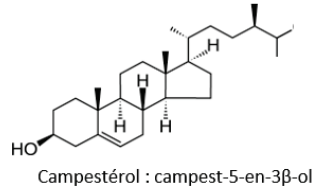
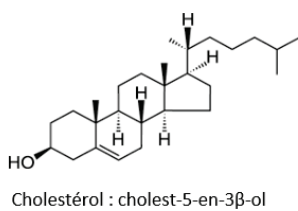


Figure 1 : Les différents lipides constituant des membranes cellulaires.

1.1.5. Géométrie des lipides

L'encombrement stérique des phospholipides membranaires permet de déterminer une géométrie globale selon la taille respective des parties hydrophiles et hydrophobes. Les principaux phospholipides comme la PC et le PG ont une forme cylindrique. Il en est de même pour le DGDG, la PS et le PI. D'autres lipides ont une forme plutôt conique. Il s'agit de la PE, du PA et du MGDG. Ceci s'explique par l'encombrement stérique de leur groupement polaire qui est moins important que la PC dans le cas du PE et du MGDG ou absent dans le cas du PA. La SM a elle aussi une forme conique mais en cône inversé (comme la lyso-PC en Figure 2) (Peetla et al., 2013).

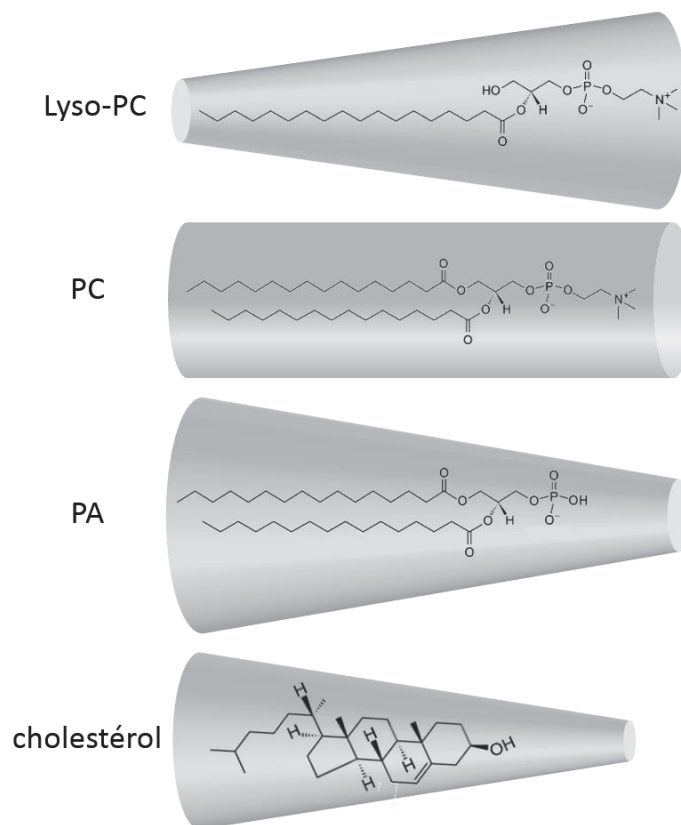


Figure 2 : Différentes géométries des lipides.

La géométrie des lipides (Figure 2) et des lipides modifiés est d'autant plus importante lorsqu'elle bouleverse la structure membranaire. Ainsi, le PA, conique comme le cholestérol et les lysophospholipides en cône inversé, sont des lipides affectant la structure globale de la membrane. De fait, la courbure dans la membrane a tendance à faciliter le bourgeonnement de celle-ci à des fins d'exo- ou d'endocytose (Peetla et al., 2013).

1.1.6. La compartimentation du vivant

L'abiogenèse est la science qui étudie l'apparition de la vie et les débuts de sa formation. Elle pose la question : comment, dans l'environnement prébiotique, est apparu le vivant. Ou comment sont apparus, à partir de molécules simples, des molécules complexes susceptibles de se multiplier de croître et de se diviser. Par constatation de l'état actuel du vivant, l'abiogenèse stipule que la toute première étape a été la compartimentation. Le vivant est compartimenté afin de rapprocher et contenir entre elles les molécules de base nécessaires à la vie et à son développement.

L'environnement prébiotique est composé de molécules simples amphiphiles parmi lesquelles des hydrocarbures et des acides gras. Sous certaines conditions de pH, les acides gras forment spontanément des micelles qui sont des structures lipidiques sphériques formant une monocouche simple où les têtes hydrophiles sont dirigées vers l'extérieur de la sphère et où les chaînes acyles hydrophobes pointent vers l'intérieur séparant ainsi un milieu aqueux d'un milieu hydrophobe (Figure 3). L'oléate en particulier a la faculté de former des vésicules spontanément à un pH élevé. Cette structure est probablement stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les carboxylates ionisés des acides gras (Blöchliger et al., 1998).

Les vésicules sont des structures formées d'une bicouche lipidique qui sépare trois compartiments :

- un compartiment hydrophile à l'extérieur de la structure ;
- un compartiment hydrophobe au sein de la bicouche lipidique ;
- un compartiment hydrophile à l'intérieur de la vésicule.

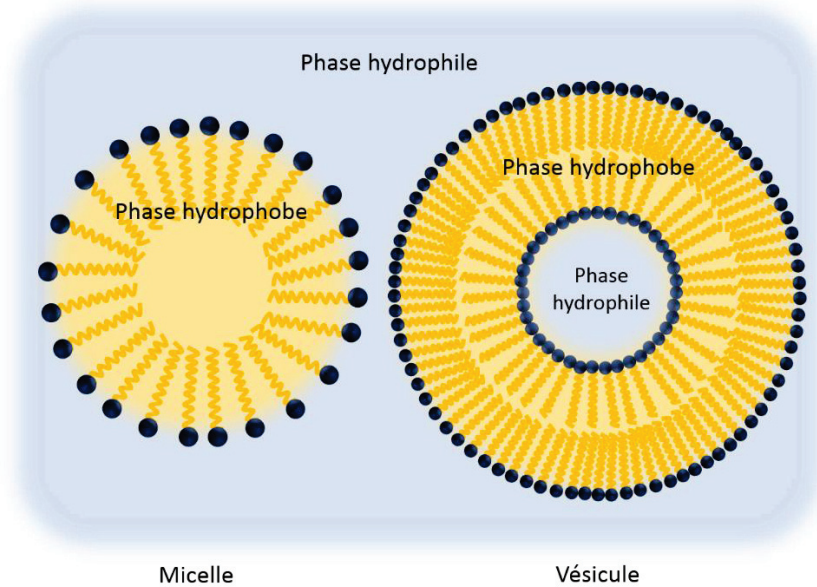


Figure 3 : Formation de structures lipidiques spontanées séparant une phase hydrophobe d'une phase hydrophile.

Ce type de structure assimilable à une proto-cellule (Figure 3) est probablement à l'origine de la compartimentation de la vie qui permet de rapprocher les molécules prébiotiques solubles dans l'eau et susceptibles d'interagir ensemble pour fabriquer, répliquer et multiplier les composants primitifs de la vie. Un tel compartiment fermé permet d'augmenter l'efficacité des réactions biochimiques et de restreindre la dissémination des produits de réaction (Szostak et al., 2001).

1.1.7. La membrane cellulaire, une mosaïque fluide ?

La membrane cellulaire est une bicouche lipidique formée de deux feuilletts qui séparent une phase aqueuse externe d'une phase aqueuse interne.

L'effet de la compartimentation du vivant induit une limitation des échanges même si l'aspect perméable de la membrane demeure pour certaines molécules de faible taille. La barrière lipidique primitive doit donc être modifiée par des macromolécules et intégrer des partenaires permettant l'échange de nutriments, le rejet ou la sécrétion d'autres molécules.

Ainsi, les membranes sont composées d'une grande diversité de lipides mais aussi de protéines membranaires qui sont :

- ancrées sur une face de la membrane ;
- transmembranaires ;
- en association transitoire avec les lipides.

Le modèle de la mosaïque fluide développé par Singer et Nicolson (Singer and Nicolson, 1972) propose que les protéines associées à la membrane soient dispersées, à faible concentration et adaptent leur surface hydrophobe aux caractéristiques figées de la bicouche lipidique. Les lipides forment une « mer » dans laquelle les protéines principalement monomériques flottent sans encombrement et la surface membranaire est directement exposée à l'environnement aqueux (Engelman, 2005).

Cependant, on sait aujourd'hui que l'aspect généraliste du modèle de Singer et Nicolson n'est pas applicable à tout le vivant. En effet, les membranes sont composées de zones particulières où se concentrent certains types de lipides, les radeaux lipidiques, de même que certaines zones riches en protéines. C'est ce que défendaient Singer et Nicholson, en postulant que ces radeaux ou « rafts » ont une mobilité importante dans les membranes. Cette mobilité est néanmoins relative dans certains types membranaires contenant beaucoup de protéines de grande taille comme la membrane interne des mitochondries avec l'ATP synthase dont l'ectodomaine est quatre fois plus important en surface que la portion transmembranaire.

L'épaisseur de la membrane varie donc selon la composition lipidique et elle dépend des protéines qu'elle intègre. Or, le modèle de base propose une forme assez figée de la membrane dans son épaisseur, ce qui indique deux possibilités :

- ou bien les protéines adaptent leur surface hydrophobe et se tordent pour s'intégrer au mieux dans la bicouche ;
- ou bien la bicouche s'adapte aux protéines qu'elle intègre.

Or, il apparaîtrait aujourd'hui que la fluidité des lipides permette à ceux-ci d'adapter la protéine transmembranaire en son sein. Ainsi plus la quantité de protéine est importante plus les dimensions de la bicouche vont varier.

Enfin, la surface de la membrane accessible à la phase aqueuse peut être très différente d'une membrane à l'autre, considérant le nombre de protéines et leur taille. Encore une fois l'exemple de l'ATP synthase est flagrant pour démontrer l'espace occupé sur la surface membranaire.

Ces constatations amènent donc certains auteurs à repenser le modèle de la mosaïque fluide, considérant que selon les cas la membrane cellulaire est quelque fois plus mosaïque que fluide (Engelman, 2005).

Les membranes cellulaires sont donc des interfaces complexes. Elles intègrent des lipides aux propriétés, charges et encombrements variés mais aussi des protéines de toute taille. C'est un

espace dynamique qui cloisonne les réactions biochimiques tout en admettant une certaine perméabilité. C'est aussi un espace d'échange entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. En effet, des protéines permettent de faire passer des grosses molécules au sein de la membrane en formant des pores et certaines vont servir à transduire la signalisation extérieure vers l'intérieur de la cellule. La membrane est la première frontière dressée face à l'environnement extérieurs, c'est donc à travers elle que doivent passer les informations de modification de l'environnement. Ajoutons à cela que la division des organismes vivants passe par la division des membranes et donc leur réorganisation constante.

1.2. Les lipases et phospholipases

La membrane est donc un véritable organe cellulaire dynamique qui est sujet à des modifications de sa structure et de ses propriétés biochimiques.

Nous montrions précédemment que les phospholipides étaient les composants majoritaires des membranes. Ce sont donc les premières cibles des enzymes lipolytiques sujettes à modification en réaction à un stress environnemental ou une réorganisation de la bicouche. Parmi ces enzymes, les lipases sont des carboxylester hydrolases qui agissent sur les glycérolipides et permettent la libération d'acides gras. Certaines d'entre elles sont tissu spécifique et on citera comme exemple l'Adipocyte Triglycérine Lipase (ATGL) responsable avec son cofacteur CGI-58 (Khatib et al., 2016) de l'hydrolyse des TG en libérant un acide gras et un DG. Les phospholipases quant à elles vont catalyser l'hydrolyse des fonctions ester carboxyliques et/ou phosphoriques des phospholipides membranaires. La modification des phospholipides permet de générer des molécules dérivées qui vont bouleverser la structure membranaire et donc les propriétés biochimiques de la cellule.

On distingue cinq types de phospholipases (Aloulou et al., 2018), réparties en deux catégories :

- Les acylhydrolases :
 - Phospholipase A₁ ou PLA₁
 - Phospholipase A₂ ou PLA₂
 - Phospholipase B ou PLB
- Les phosphodiesterases :
 - Phospholipase C ou PLC
 - Phospholipase D ou PLD.

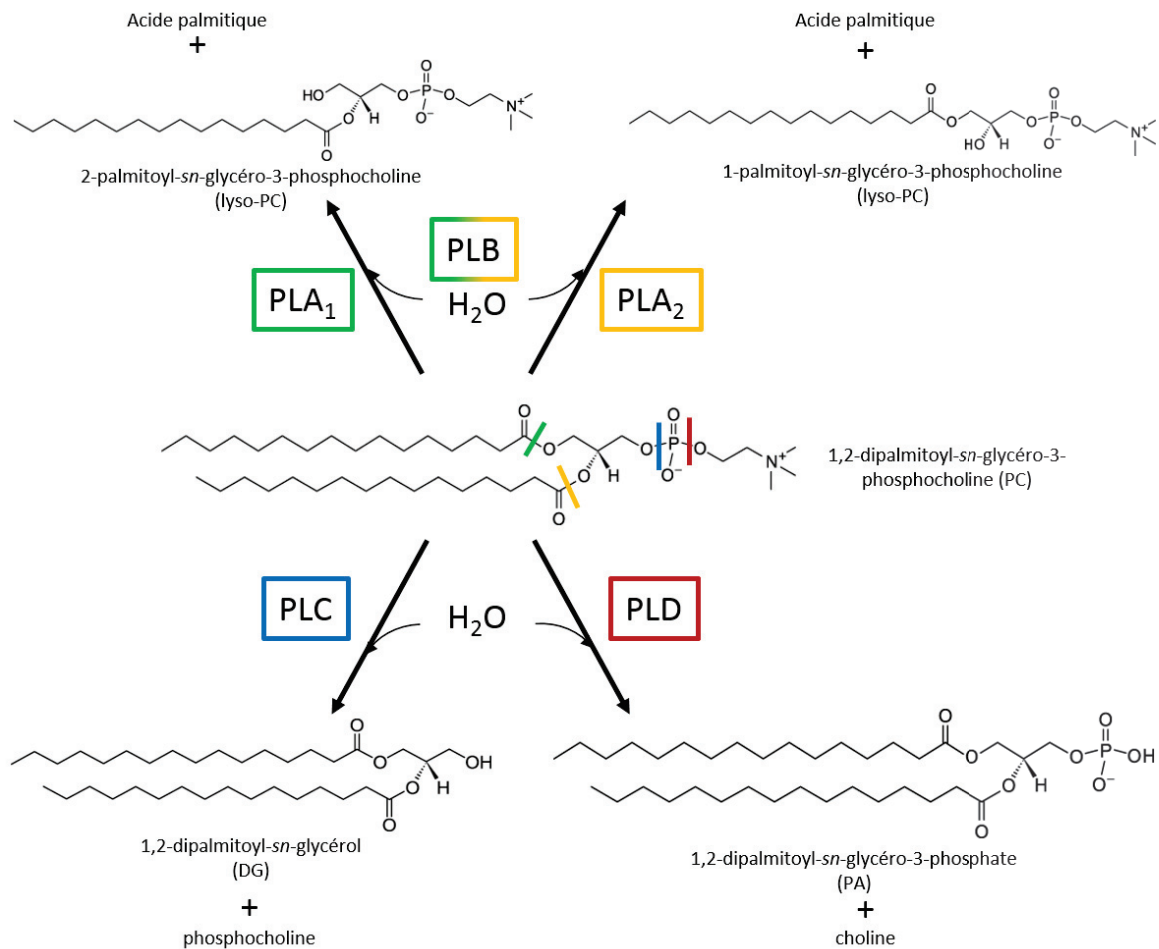


Figure 4. Action d'hydrolyse des différentes phospholipases sur la PC

1.2.1. Phospholipases A₁

Les PLA₁ (EC 3.1.1.32) sont des acylhydrolases qui catalysent l'hydrolyse de la liaison ester carboxylique en position *sn*-1 des phospholipides et libèrent un 2-acyl-lysophospholipide et un acide gras (Figure 4). Les PLA₁ possèdent la triade catalytique Ser-His-Asp typique chez les lipases ainsi qu'un repliement similaire de type α/β hydrolase, ces caractéristiques classent certaines PLA₁ avec le groupe des lipases pancréatiques. Les PLA₁ possèdent cependant un plus petit volet amphiphile couvrant le site actif et une boucle en moins (Aoki et al., 2007). Certaines PLA₁ sont très spécifiques de leur substrat. On distingue par exemple, les PS-PLA₁ et les PA-PLA₁, mais d'autres PLA₁ ont une plus large capacité d'hydrolyse puisqu'elles peuvent hydrolyser aussi bien les phospholipides que les TG ou les galactolipides. Les lysophospholipides produits par la PLA₁ sont d'importants médiateurs comme le lyso-PS ou le lyso-PA (Aloulou et al., 2018).

1.2.2. Phospholipases A₂

Les PLA₂ (EC 3.1.1.4) sont des acylhydrolases qui catalysent l'hydrolyse de la liaison ester carboxylique en *sn*-2 des phospholipides et libèrent un 1-acyl-lysophospholipide et un acide gras (Aloulou et al., 2018). La chaîne acyle située en *sn*-2 est généralement un acyl polyinsaturé qui, une fois libéré, peut être métabolisé pour former des médiateurs lipidiques tels que des eicosanoïdes.

Les PLA₂ sont regroupées au sein d'une superfamille dans laquelle les enzymes partagent la même fonction catalytique. On distingue six types de PLA₂ :

- La PLA₂ cytosolique ou cPLA₂ appartient à une famille de protéines qui comprend six isoformes différentes (Leslie, 2015). Elles contiennent toutes une diade catalytique Ser-Asp et un domaine C2 (*Calcium-lipid Binding Domain*) en N-terminal (à l'exception de l'isoforme γ). La fixation du calcium sur le domaine C2 permet un changement conformationnel et l'exposition de boucles hydrophobes qui vont pénétrer au sein de la membrane. L'activité catalytique est régulée par la phosphorylation de résidus séryles par des protéines kinases et l'interaction de la PLA₂ avec des polyphosphoinositides.
- La PLA₂ calcium-indépendante ou iPLA₂ appartient à une famille de protéines qui comprend dix isoformes différents (Kienesberger et al., 2009). Elles contiennent toutes deux motifs consensus dont l'un est spécifique des lipases et l'autre est impliqué dans la fixation de nucléotides. Le site catalytique des iPLA₂ est similaire à celui des cPLA₂ et ne montre pas de spécificité de substrat particulière. On note des activités de type PLA₁/PLA₂, lysophospholipase, transacylase et thioesterase indiquant une grande diversité fonctionnelle au sein de cette famille d'enzymes (Aloulou et al., 2018).
- La PLA₂ responsable de l'hydrolyse du *platelet activating factor* ou PAF-AH (*Platelet Activating Factor AcylHydrolase*) catalyse l'hydrolyse de l'acétate en position *sn*-2 du PAF. Cette famille d'enzymes comprend quatre membres calcium-indépendants dont un est sécrété et connu sous le nom de PAF-AH de type plasmatique ou associé aux lipoprotéines (Lp-PLA₂). Les trois autres sont des enzymes intracellulaires appelées PAF-AH type II homologues au Lp-PLA₂ et PAF-AH type I qui est composé d'un homo- ou hétérodimère de deux sous-unités catalytiques étroitement liées. Tous partagent un repliement typique α/β hydrolase et la triade catalytique Ser-His-Asp typique des lipases. La Lp-PLA₂ en particulier semble jouer un rôle central dans la physiopathologie de l'athérosclérose, de son initiation à la progression des

complications cardiovasculaires. De fait, les produits issus de l'hydrolyse des phospholipides oxydés par Lp-PLA₂ sont pro-inflammatoires et jouent un rôle important dans l'inflammation et, par conséquent, dans l'athérosclérose (Wilensky et al., 2008).

- La PLA₂ lysosomale (LPLA₂) est une protéine localisée dans les lysosomes et caractérisée par un pH acide pour la catalyse. Il y a deux types de la LPLA₂. La PLA₂ calcium indépendante (aiPLA₂ pour *acidic calcium independent*) et la LPLA₂. La aiPLA₂ possède une activité glutathion peroxydase en plus de l'activité PLA₂. Ces deux activités sont situées sur deux motifs catalytiques différents au sein de l'enzyme. La LPLA₂ est une protéine homologue de la lécithine cholestérol acyltransférase. Elle permet le transfert d'un groupement acyl sur un cholestérol pour former un ester de cholestérol (Hiraoka et al., 2006).
- La PLA₂ adipocytaire ou adPLA₂ est abondamment retrouvée dans le tissu adipeux blanc et permet la libération d'acide arachidonique au sein de ce tissu pour la synthèse des prostaglandines. Cette enzyme appartient de surcroît à la famille des lécithines rétinols acyltransférases. Une étude sur l'invalidation du gène de l'adPLA₂ suggère que cette enzyme peut favoriser l'obésité grâce à un mécanisme distinct de la signalisation des prostaglandines (Wolf, 2009).
- La PLA₂ sécrétée ou sPLA₂ est une enzyme de faible masse moléculaire (14 à 19 kDa) qui contient une diade catalytique His/Asp. Cette enzyme est calcium dépendante et cible des phospholipides extracellulaires. On note onze isoformes différentes qui se distinguent notamment par leur spécificité tissulaire, leur spécificité de substrat et leur cofacteur (Murakami et al., 2015). Certaines PLA₂ vont effectivement avoir un rôle défensif en ciblant préférentiellement le PE et le PG, composants majoritaires des membranes bactériennes.

L'assignation d'une PLA₂ à un certain groupe est basée sur le mécanisme catalytique, la localisation et des caractéristiques structurales. Des propriétés pour lesquelles ces enzymes sont très diverses d'un groupe à l'autre (Aloulou et al., 2018).

1.2.3. Phospholipases B

Les PLB catalysent l'hydrolyse des liaisons esters en positions *sn*-1 et *sn*-2 des phospholipides et lysophospholipides (activité lysophospholipase EC 3.1.1.5) (Figure 4). Ces enzymes ont aussi une activité acyltransférase qui leur permet de transférer un acide gras sur un lysophospholipide et de former ainsi un phospholipide (Chen et al., 1997).

1.2.4. Phospholipases C

Les PLC (EC 3.1.4.3) sont des phosphodiesterases qui catalysent l'hydrolyse de la partie proximale de la liaison phosphodiester des glycérophospholipides, permettant de générer du DG et un groupement polaire phosphorylé (Figure 4). On distingue deux types de PLC : les PC-PLC et les PI-PLC.

Les PC-PLC, appelées aussi des PLC non spécifiques, hydrolysent une large gamme de substrats phospholipidiques mais ont une activité préférentielle d'hydrolyse de la PC. La structure 3D de la PLC de *B. cereus* montre que l'enzyme est constituée de sept hélices α formant un tonneau avec trois atomes de zinc (Zn^{2+}) coordonnés au sein du site actif (Hough et al., 1989). Le résidu nucléophile du site actif est supposé fixer de façon covalente le groupement phosphate des phospholipides dans un mécanisme de type « ping-pong ». De plus la PC-PLC est une toxine importante chez de nombreux pathogènes ; elle est aussi impliquée dans de nombreux processus cellulaires chez les mammifères comme l'apoptose, la différenciation neuronale, l'activation du système immunitaire ou de facteurs de transcription (Aloulou et al., 2018).

Les PI-PLC sont des enzymes calcium-dépendantes qui appartiennent à une famille de treize membres classés en six catégories sur la base de leur séquence et de leur structure. On note cinq domaines conservés dans presque toutes les isoformes. Le domaine PH (*plekstrin homology*), le domaine *EF-hand like*, les domaines catalytiques X et Y et un domaine C2. Certaines isoformes possèdent en plus un domaine *SRC homology* ou *Ras activation*. Ces enzymes hydrolysent spécifiquement la liaison phosphodiester proximale du PI-4,5-P₂. Elles permettent ainsi la libération du DG et de l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃). Le DG est un lipide neutre qui reste dans les membranes et active la PKC alors que l'IP₃ est cytosolique et participe à la régulation du calcium intracellulaire.

1.2.5. Phospholipases D

Les PLD (EC 3.1.4.4) sont des phosphodiesterases qui catalysent l'hydrolyse de la partie distale de la liaison phosphodiester des glycérophospholipides, permettant de générer du PA et un groupement polaire soluble dans l'eau (Figure 4). Ces enzymes catalysent aussi une réaction de transphosphatidylolation au cours de laquelle elles transfèrent le PA covalamment lié à l'enzyme sur un alcool primaire, générant ainsi un phosphatidylalcool (Figure 5).

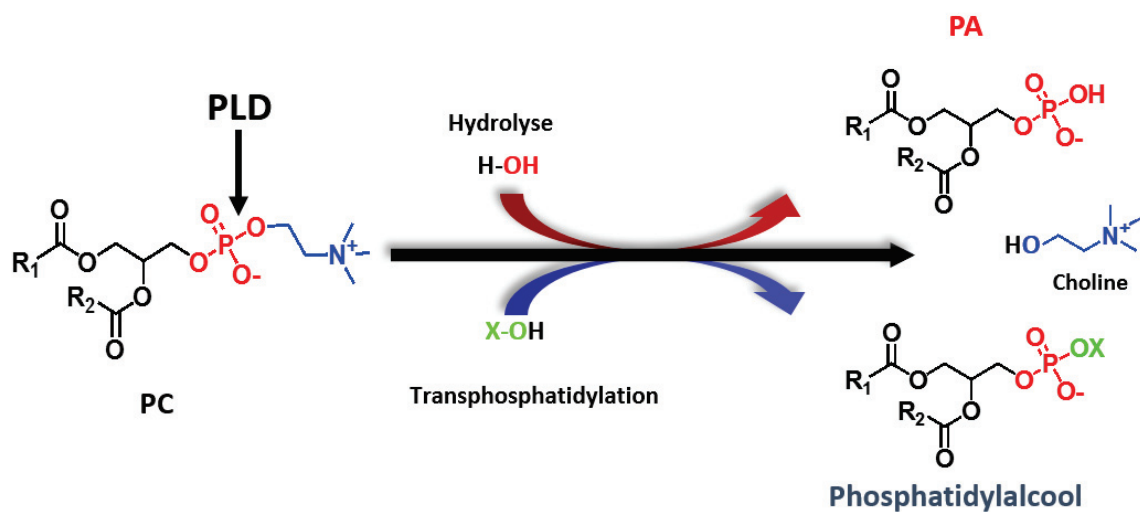


Figure 5 : Action catalytique d'hydrolyse et de transphosphatidylation de la PLD.

À l'instar des autres phospholipases décrites, la PLD a un rôle central dans les propriétés biochimiques des membranes biologiques par le second messager qu'elle génère (PA) et le remodelage membranaire que sa réaction de transphosphatidylation permet.

La phospholipase D appartient à la superfamille des PLD, une vaste famille de protéines dont la composition est discutable à partir du moment où elle regroupe des protéines aussi diverses dans leur fonction que dans leur structure.

Historiquement, les enzymes provoquant la libération de la choline ont été classées parmi les PLD et donc membres à part entière de la superfamille des PLD. Cette superfamille englobe des enzymes dont l'activité consiste à hydrolyser des liaisons phosphoesters telles qu'il en existe dans l'ADN ou les phospholipides membranaires. Ainsi, cette superfamille comprend des endonucléases comme Nuc qui hydrolyse de manière non spécifique les liaisons phosphoesters de l'ADN et est susceptible d'entretenir un rôle dans la conjugaison des bactéries. Elle comprend également BfiI, une enzyme de restriction qui hydrolyse de manière spécifique l'ADN sur un site non palindromique, et K4 une endonucléase virale d'orthopoxvirus qui faciliterait la condensation et le repliement du génome viral. La CL-synthase, une protéine à motif HKD, ou la PS-synthase qui catalysent les réactions de synthèse de CL et de PS par transphosphatidylation respectivement, appartiennent aussi à cette vaste superfamille. Enfin et surtout, cette superfamille comprend des phosphodiésterases comme les PLD.

Avec les avancées technologiques de séquençage et de clonage, il apparaît que cette superfamille est composée de deux types de protéines dont la distinction majeure se situe dans leur motif catalytique qualifié de « HKD ». D'aucuns considèrent que les enzymes sans motifs HKD ne font pas partie de cette superfamille (Selvy et al., 2011), cela revient à exclure des enzymes aux fonctions identiques mais structurellement différentes alors que l'inclusion d'enzymes à motifs HKD permet la considération d'enzymes tout aussi éloignés des PLD en terme d'activité enzymatiques comme les nucléases.

Ces travaux de thèse se concentrent sur ce dernier type de PLD. Afin de caractériser au mieux la fonction et la structure des PLD, il est important de comprendre le cheminement scientifique de la recherche à ce sujet depuis la découverte des PLD.

1.3. État de la recherche sur la PLD

1.3.1. Historique

La PLD a été découverte en 1947 à la suite d'une caractérisation chimique des phospholipides de la carotte (Hanahan and Chaikoff, 1947a). Les auteurs en décrivent deux types qui diffèrent dans leur composition en choline :

- un type est purifié à partir de la carotte crue et ne possède que peu de choline ;
- le second type de phospholipide extrait à partir de carotte cuite à la vapeur contient sensiblement plus de choline (Hanahan and Chaikoff, 1947a).

L'obtention de fractions pauvres en choline dans les carottes crues suggère la similarité entre ces phospholipides et le PA (déjà obtenu en 1929 à partir de feuilles de chou (Channon and Chibnall, 1929)).

À l'inverse, peu de PA est retrouvé dans les fractions issues des carottes cuites à la vapeur. Le phospholipide extrait de cette fraction (PC) est le phospholipide naturel non modifié par un traitement enzymatique qui peut avoir lieu pendant l'extraction à partir de carotte crue. Les auteurs postulent donc qu'une enzyme capable de libérer la choline des phospholipides existe dans la carotte crue, ils l'appellent la lécithinase.

En réalité, le terme de lécithinase existait déjà depuis 1933 avec les Italiens Contardi & Ercoli (Contardi and Ercoli, 1933). Ceux-ci décrivent quatre types de lécithinases qu'on appelle aujourd'hui les phospholipases (Figure 6) et dont les sites d'action ont été redéfinis par Hanahan

en 1947 (Hanahan, 1947). La lécithinase A (aujourd'hui PLA₁), B (aujourd'hui PLA₂), C (aujourd'hui PLD) et D (aujourd'hui PLC).

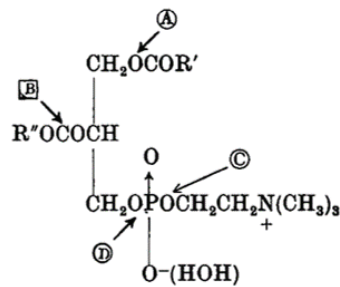


Figure 6 : Site d'action des lécithinases A, B, C et D (Hanahan, 1947).

A cette époque, seules les phospholipases A₁, A₂ et C sont connues et les auteurs postulent l'existence de la PLD. Il faut attendre 1947 pour qu'Hanahan et Chaikoff dans leur second article décrivent une enzyme qui clive la liaison phosphodiester distale des phospholipides, libérant le PA d'une part et la choline d'autre part (Hanahan and Chaikoff, 1947b). Ils reproduisent leurs observations chez le chou un an plus tard (Hanahan and Chaikoff, 1948).

La première preuve *in vitro* d'une activité PLD d'hydrolyse a lieu avec l'incubation de la lécithine d'œuf en présence d'un extrait brut de protéines solubles de latex : la libération de la choline peut alors être observée (Smith, 1954). Le terme de PLD apparaît dans la littérature peu après (Tookey and Balls, 1956a). Les auteurs montrent une nouvelle fois la présence de la PLD en tant que protéine soluble dans les graines de coton et les feuilles de chou. Au cours de la même étude, ils sont les premiers à purifier partiellement l'enzyme et à moduler son activité, en l'augmentant avec le NaCl ou en l'inhibant avec le NaF.

En 1958, une plus large étude montre la présence de l'activité PLD dans différents végétaux comme le chou, le navet, la laitue, la carotte, la pomme de terre, la betterave, le pois, le persil et l'oignon (Davidson and Long, 1958). C'est aussi la première fois que l'effet du Ca^{2+} en tant qu'activateur de la PLD est prouvé. De même, les auteurs montrent que les ions strontium et baryum activent la PLD. Les autres molécules comme le Zn^{2+} ont peu d'effets ou sont légèrement inhibiteurs (comme le NaCl, KCl, NH_4Cl , MgCl_2 , MnCl_2 et FeCl_3).

Deux équipes montrent ensuite simultanément, une activité phosphatase retrouvée dans le foie de rat et de poulet qui hydrolyse la phosphosérine en orthophosphate et sérine (Borkenhagen and Kennedy, 1958 ; Neuhaus and Byrne, 1958). Il s'agit alors de la première preuve d'une activité PLD chez les mammifères.

La réaction de transphosphatidylation (Figure 5), seconde activité de la PLD, est découverte un an plus tard en 1967 (Yang et al., 1967). Au cours de cette réaction, la PLD transfère le groupement phosphatidyl d'un phospholipide sur un alcool primaire. Cette démonstration s'effectue alors avec une PLD de chou partiellement purifiée.

La première mention d'une enzyme bactérienne date de la même période. Une équipe autrichienne a mis à jour une enzyme dans les toxines de *Corynebacterium ovis* clivant la sphingomyéline, mais aussi la PC, qui libère le PA et la choline (Souček et al., 1967). Les auteurs attribuent ainsi cette enzyme à la famille des PLD. La purification d'une PLD bactérienne à homogénéité s'effectue avec l'enzyme sécrétée de *Streptomyces hachijoensis* (Okawa and Yamagushi, 1975). C'est ce qui constitue la première purification d'une PLD.

De son côté, la PLD humaine est partiellement purifiée en 1976 à partir d'éosinophiles (Kater et al., 1976). Elle ne sera pourtant clonée que 20 ans plus tard (Hammond et al., 1995).

Ce clonage fait partie d'un tournant majeur de la recherche sur la PLD qui a eu lieu dans les années 90. Au cours de ces années, on rapporte la mise au point d'une technique de purification des PLD végétales sur un support hydrophobe : l'Octyl Sépharose® (Lambrecht and Ulbrich-Hofmann, 1992). Les années qui suivent, on assiste à la purification à homogénéités des PLD de chou (Abousalham et al., 1993), de ricin (Wang et al., 1994), de soja (Abousalham et al., 1995), et de tournesol (Abousalham et al., 1997a).

Au cours de cette période, on rapporte aussi les clonages de la PLD de *Streptomyces antibioticus* (Iwasaki et al., 1999a), de la PLD de la levure *Saccharomyces cerevisiae* SPO14 (Rose et al., 1995), de la PLD humaine (Hammond 1995) au cours de laquelle on note la première mention de l'existence du motif HKD et de la PLD1 de souris (Colley et al., 1997).

Les premiers à cloner une PLD de mammifères sont aussi les premiers à positionner les domaines HKD au sein de la séquence de ces enzymes (Figure 7) et à souligner leur similarité (Hammond et al., 1995). La même équipe décrit plus tard quatre zones ou séquences conservées chez les PLD : les zones II et IV contiennent les domaines HKD, les zones Ia, Ib et III sont d'autres domaines conservés (Figure 7) (Sung, 1997).

Enfin, point culminant de la littérature de cette période, en 1996 Ponting & Kerr définissent la notion de superfamille de PLD. Pour la première fois ils montrent que toutes les PLD décrites jusqu'à présent partagent les mêmes caractéristiques de structure primaire. Ainsi, ils définissent quatre zones particulières au sein de la séquence de l'enzyme. Quatre motifs dupliqués à partir

desquels ils postulent sur une structure bilobée pour les PLD, chaque lobe portant un exemplaire des quatre motifs (Ponting and Kerr, 1996) (Figure 7). Ceux-ci découpent le motif HKD en deux parties, en N-terminal HXKX₄D - GG/GRY et en C-terminal HXKX₄D - GSANIN (Figure 7) (Ponting and Kerr, 1996). Les auteurs de cette même étude montrent que le domaine HKD est également retrouvé dans d'autres enzymes, telles que la CL-synthase et la PS-synthase, ainsi que dans les protéines de l'enveloppe de certains virus et dans plusieurs endonucléases.

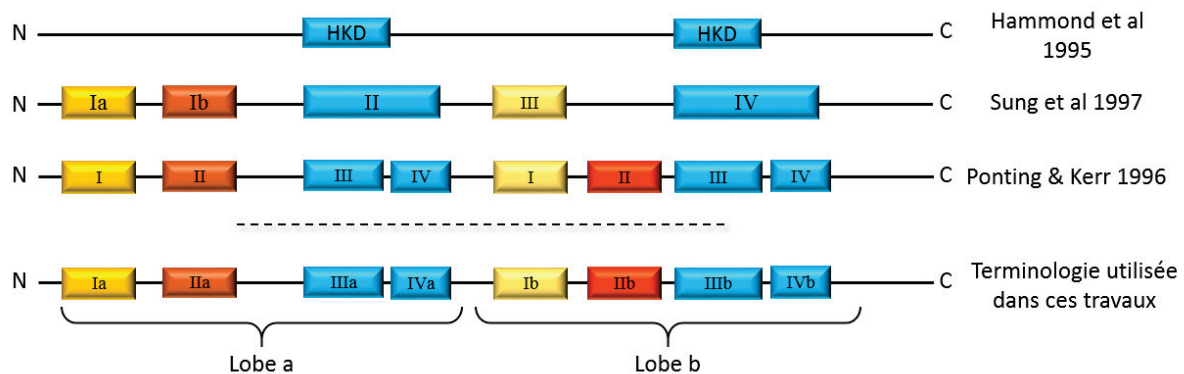


Figure 7 : Représentation schématique des différents domaines décrits sur la structure primaire du cœur catalytique des PLD et proposition d'une terminologie pour la description de ces travaux de thèse.

Cette terminologie plus précise et plus juste est celle que nous utiliserons dans ces travaux pour décrire les motifs conservés au sein des PLD. En effet, dans cette interprétation de la séquence, les motifs sont clairement en regard les uns des autres et on distingue nettement deux lobes de composition identique, un lobe « a » en N-terminal avec les motifs Ia, IIa, IIIa et IVa et un lobe « b » en C-terminal avec les motifs Ib, IIb, IIIb et IVb.

Allant dans le sens d'une structure bilobée, la meilleure preuve de concept à ce sujet est à attribuer à une équipe de recherche qui, en 1998 (Xie et al., 1998), montre la réunion des deux motifs HKD de la PLD de rat lorsque celle-ci est exprimée en deux parties. Ainsi, l'expression indépendante de chaque portion d'enzyme portant un motif HKD reforme une enzyme active par la réunion de ces deux portions *in vivo*.

La première structure 3D d'une PLD est celle de *Streptomyces sp.* PMF résolue par la méthode de cristallographie en 2001 (Leiros et al., 2000). Notons qu'auparavant une structure d'une enzyme de la superfamille des PLD avait déjà été résolue avec la nucléase Nuc (Stuckey and Dixon, 1999). Nous développerons l'aspect structural des PLD ci-après en préliminaires à nos travaux sur la structure d'une PLD de plante.

Parmi les multiples études participant à caractériser la fonction des PLD, on remarquera une étude de mutagenèse dirigée effectuée sur la PLD humaine et qui met en avant l'importance de

l'intégrité des motifs HKD (Sung, 1997). Entre autres études de moindre importance, la seule qui rapporte la construction d'une banque de mutants sur la PLD végétale a été publiée en 2006 (Lerchner et al., 2006). Les auteurs effectuent alors une série de mutants de la PLD de chou afin de caractériser les résidus favorisant l'aspect hydrolytique ou de transphosphatidylation des PLD.

La même équipe publie un an plus tard la seule information structurale à ce jour sur les PLD eucaryotes avec le modèle SAXS de la PLD de chou décrivant une enzyme globulaire aux extrémités allongées et lâches (Stumpe et al., 2007).

Cette liste bibliographique non exhaustive s'attache à rapporter les points culminants de la recherche sur les PLD en amont et après leur découverte. Ce que l'on observe c'est tout d'abord que les PLD ont été théorisées avant d'être découvertes. En parallèle de l'activité des autres phospholipases, celle des PLD a été supposée. C'est ensuite avec la disparition du substrat et la libération de choline à partir de la PC que l'on note la première preuve d'activité PLD. Puis la réaction d'hydrolyse a été démontrée et modulée, voire inhibée, toujours en suivant la libération de la choline.

Les premières preuves ont donc été constatées chez les végétaux. Plusieurs raisons expliquent cela, tout d'abord la facilité d'usage et d'accessibilité de ces organismes mais aussi et surtout le fait que l'activité PLD soit détectable relativement facilement dans les extraits bruts des plantes. Ainsi, l'aspect ubiquitaire de ces enzymes chez les végétaux a rapidement émergé et s'est ensuite élargi aux mammifères puis aux bactéries.

C'est d'ailleurs grâce aux bactéries qui sécrètent la PLD qu'une structure a été résolue, la sécrétion et la quantité de protéine disponible facilitant la purification puis l'étude par cristallographie.

Il a ensuite été compris que ces enzymes étaient majoritairement solubles chez les végétaux comme chez les bactéries alors qu'elles sont membranaires chez les mammifères.

La littérature actuelle s'attache, voire se confine, à caractériser la PLD humaine dans le cadre pathologique. On rapportera la récente étude du rôle de la PLD1 dans la maladie de Parkinson (Conde et al., 2018) ou encore de la PLD3 dans la maladie d'Alzheimer (Mukadam et al., 2018). Ceci s'explique par la forte implication de l'enzyme dans des pathologies majeures où il a été montré que son inhibition spécifique constituait un réel espoir thérapeutique (Chen et al., 2012). En réalité, peu d'équipes travaillent sur les PLD végétales si ce n'est pour trouver une enzyme

à forte activité de transphosphatidylase et donc susceptible de fabriquer de nouveaux phospholipides et de caractériser ainsi une fonction à visée industrielle. Une étude récente rapporte que l'inhibition de la PLD chez la framboise permet d'augmenter la durée de conservation de ce fruit (Kayal et al., 2017). De rares études rapportent une caractérisation biochimique plus fondamentale sur la PLD végétale. Récemment, la PLD de graine de moutarde a été clonée afin de caractériser une nouvelle PLD (Khatoon et al., 2015) et une étude provenant de notre laboratoire caractérise le domaine régulateur de la PLD d'*A. thaliana* afin de comprendre le mécanisme d'interaction avec la membrane et d'activation interfaciale (Rahier et al., 2016a).

L'étude menée dans ce travail de thèse porte pour partie sur le traitement des séquences de PLD végétales afin de déterminer les zones les plus conservées au sein de celles-ci. Nous pourrions ainsi muter les résidus les plus importants et discuter la topologie de la structure primaire pour actualiser le modèle de Ponting & Kerr (Figure 7) et modéliser la structure 3D de la PLD végétale.

1.3.2. Le modèle de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*

La plante *Arabidopsis thaliana* a été proposée comme modèle en génétique végétale en 1943 (Laibach, 1943), ce qui est devenu officiellement le cas depuis les années 1980 du fait que cette plante possède un petit génome, un faible temps de génération, et une facilité de croisement et de fécondation (Meyerowitz and Pruitt, 1985).

Il existe 12 types de PLD chez *Arabidopsis thaliana* classées en groupes α , β , γ , δ , ϵ et ζ selon leur similarité de séquence, leur architecture génique et la structure de leurs domaines. Toutes possèdent deux domaines HKD et un domaine C2 à l'exception de la PLD ζ pour laquelle le domaine C2 est substitué par les domaines PH et PX, deux domaines retrouvés dans la PLD humaine et SPO14 (Pappan et al., 2004; Selvy et al., 2011). L'ensemble des travaux de recherches décrits dans cette thèse sont focalisés sur l'isoforme α de la PLD qui est l'isoforme majoritaire chez les végétaux.

Les débuts de l'étude de la PLD α (objet de ce travail de thèse) chez *A. thaliana* remontent à 1995 avec son clonage à partir d'ARNm (Dyer et al., 1995). Les auteurs étudient alors le phénomène de sénescence chez la plante. Ce phénomène est caractérisé par une dégradation des phospholipides et une déstructuration des membranes. Considérant que l'activité PLD est plus importante lors de la sénescence et du stress cellulaire, les auteurs partent du principe que

la PLD procède à la première étape de dégradation des phospholipides pour générer du PA qui est ensuite converti en DG par une PA phosphatase. Le DG est ensuite déacylé par une acyl hydrolase non spécifique pour libérer les acides gras (Fan et al., 1997). En 1997, le gène codant la PLD d'*A. thaliana* est exprimé dans *E. coli* (Pappan et al., 1997).

Au cours des travaux de recherche présentés ci-après, nous utilisons le gène d'*A. thaliana* codant la PLD α cloné en 1995 (Dyer et al., 1995).

L'autre PLD que nous utilisons pour étudier la structure de cette famille d'enzymes a été clonée en 1999 à partir de la plante *Vigna unguiculata* (El Maarouf et al., 1999). Les auteurs partent du constat de la forte dégradation des phospholipides dans les périodes de sécheresse et postulent qu'il s'agit principalement d'une activité PLD. En 2000, le gène est alors exprimé en cellules d'insecte (El Maarouf et al., 2000) puis en 2007 dans la levure *Pichia pastoris* (Ben Ali et al., 2007). Au cours de ces deux études l'enzyme est purifiée à homogénéité et caractérisée biochimiquement.

1.3.3. La superfamille des PLD

La PLD appartient à une vaste superfamille dont les membres se distinguent principalement par la séquence du motif catalytique. On distingue donc les PLD à motifs consensus HKD (HXKX₄D) des PLD sans motifs HKD.

1.3.3.1. Les PLD à motifs HKD

Le motif HKD a été décrit pour la première fois en 1995 lors du clonage de la PLD humaine (Hammond 1995). Cependant, ce n'est qu'en 1996 que Ponting & Kerr décrivent ce motif chez plusieurs phosphodiesterases regroupant ainsi des protéines avec une activité PLD (Ponting & Kerr, 1996). Ce motif HKD est alors décrit en parallèle à plusieurs motifs conservés, dupliqués et classés de 1 à 4 (Figure 7).

Notons que ce motif a été décrit la même année comme une séquence consensus HXKX₄D invariablement présente chez toutes ces protéines et dupliquée dans la structure primaire de celle-ci (Koonin, 1996). Ainsi, on distinguera le motif HKD N-terminal du motif HKD C-terminal.

Quelques exceptions existent dans cette superfamille où des protéines ne vont exhiber qu'un seul motif HKD dans leur séquence. C'est le cas de l'endonucléase Nuc et de la PLD6 humaine ou mitoPLD. Il apparaît alors que ces enzymes dimérisent pour former une enzyme active, la

dimérisation permettant de réunir les deux motifs HKD au sien de la même poche catalytique (cf. 1.3.3.6. La structure des PLD).

Les PLD des règnes microbiens, végétaux et animaux n'ont que peu d'identité de séquences primaires ; cependant certaines régions, comme la séquence consensus "HKD" catalytique, demeurent extrêmement bien conservées. Selon les espèces, les PLD présentent un ou plusieurs domaines régulateurs capables d'interagir avec la membrane. Ainsi, les PLD de mammifères possèdent un domaine *Phox* (PX) et un domaine *Pleckstrin Homology* (PH). Le domaine PX est présent dans de nombreuses protéines de signalisation et fixe le PI-4,5-P₂ (Xu et al., 2001). Le domaine PH est retrouvé chez des protéines impliquées dans la transduction du signal (Gibson *et al.*, 1994). La région amino-terminale des PLD de plantes, qui sont Ca²⁺ dépendants, est homologue aux domaines C2 à savoir un domaine régulateur de fixation du Ca²⁺ très bien conservé, et impliqué dans la transduction du signal et le trafic membranaire. Il participe ainsi à l'interaction protéine-lipide Ca²⁺-dépendante (Pappan *et al.*, 2004) et est présent dans différentes protéines impliquées dans des processus de signalisation cellulaire et/ou interagissant avec les phospholipides (Zheng *et al.*, 2000). On retrouve aussi les domaines PX et PH dans l'isoforme ζ des PLD de plantes et dans la PLD de levure SPO14 qui possède en plus un domaine de phosphorylation/localisation en N-terminal (Figure 8).

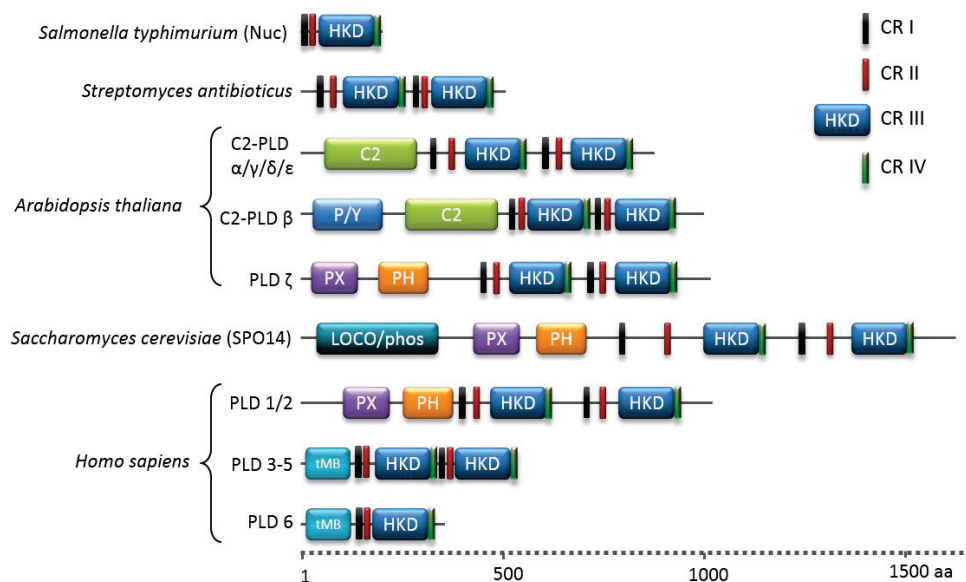


Figure 8 : Représentation schématique des domaines présents dans les PLD de bactérie (*Streptomyces antibioticus*), de plante (*Arabidopsis thaliana*), de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), de mammifère (*Homo sapiens*) et dans l'endonucléase Nuc.

Les zones noires et rouges correspondent respectivement aux séquences consensus CRI et CRIII. C2 : domaine C2 ; P/Y : domaine riche en proline et tyrosine ; PX : domaine Phox ; PH : domaine Plekstrin homology ; LOCO/phos : domaine de phosphorylation et de localisation à l'endosome ; tMB : domaine transmembranaire.

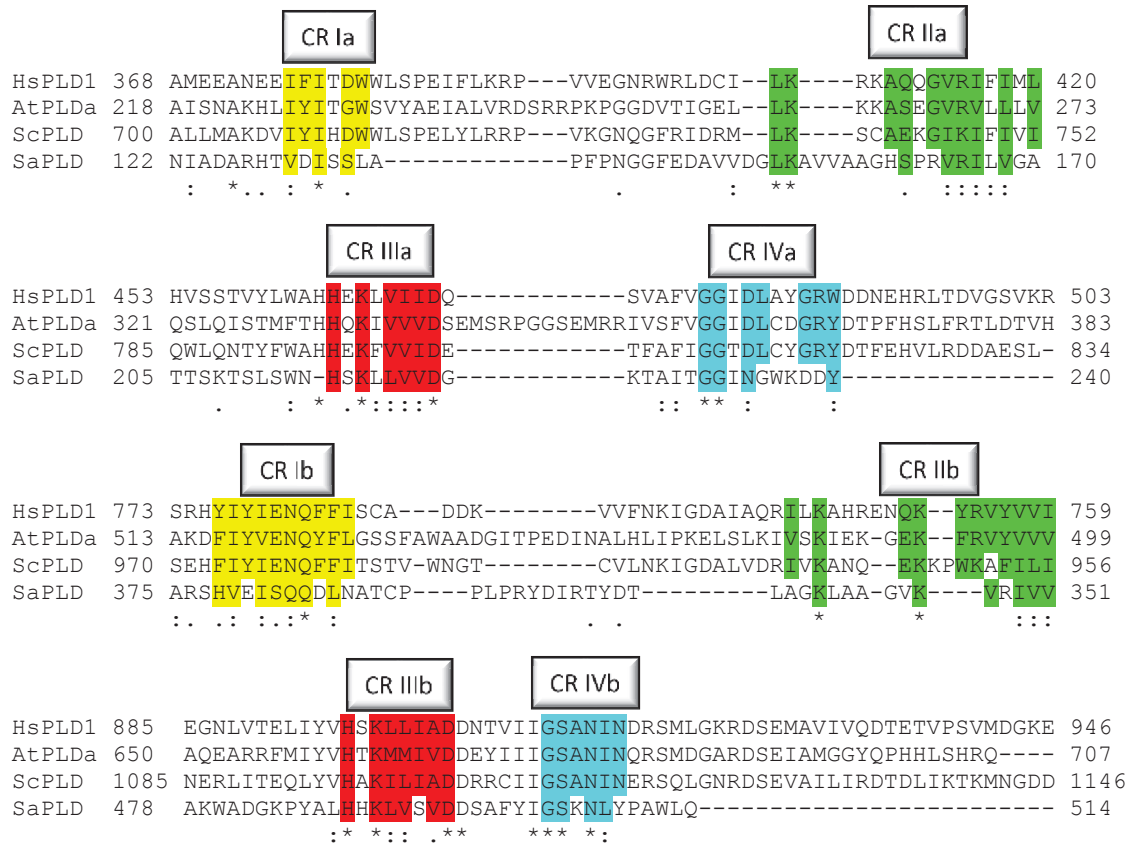


Figure 9 : Alignement des PLD de mammifère, de plante, de levure et de bactérie autour des quatre régions consensus décrites par Ponting & Kerr (Ponting and Kerr, 1996).

HsPLD1 : PLD1 humaine (*Homo sapiens*) ; *AtPLDa* : PLDa d'*A. thaliana* ; *ScPLD* : PLD SPO14 de *S. cerevisiae* ; *SaPLD* : PLD bactérienne de *Streptomyces antibioticus*. CR : « consensus region ».

Ponting & Kerr (Ponting and Kerr, 1996) ont donc décrit quatre zones consensus dupliquées (a et b sur la Figure 9) parmi lesquelles se trouvent les motifs HKD (CR IIIa et b). Ces quatre séquences représentatives de PLD à motifs HKD comprennent une séquence procaryote de bactérie (*Streptomyces antibioticus*), et trois séquences eucaryotes dont une de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), une de plante (*Arabidopsis thaliana*) et une de mammifère (*Homo sapiens*) (Figure 9). L'analyse chiffrée de leur état de conservation calculée à partir de l'alignement individuel de chaque CR indique que le taux de conservation est variable (Figure 10).

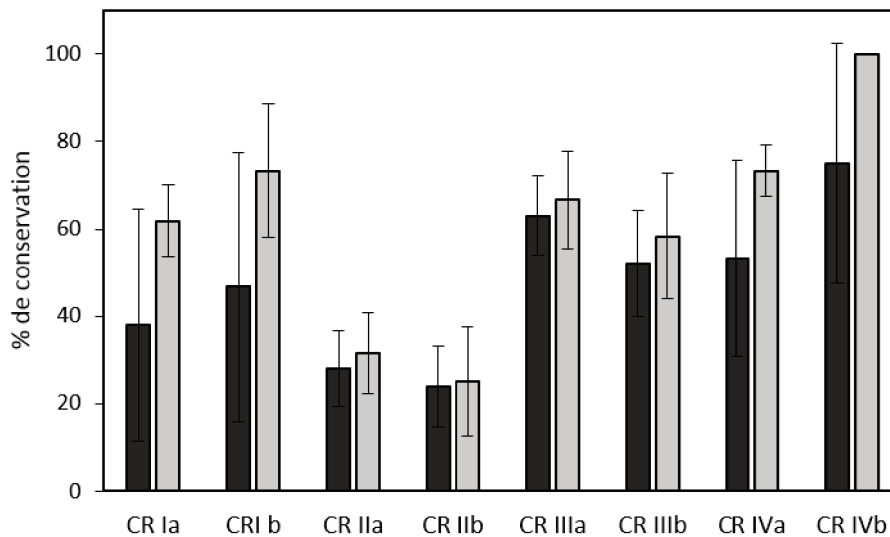


Figure 10 : Moyenne des pourcentages d'identité de séquence entre les différents CR
 En foncé : le pourcentage d'identité des CR entre les quatre séquences de *Streptomyces antibioticus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* et *Homo sapiens*. En clair : le pourcentage d'identité des CR entre les séquences eucaryotes, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* et *Homo sapiens*.

Cette variabilité est en partie due à la présence de l'enzyme procaryote qui semble moins conservée que celle des eucaryotes au niveau des CR (Figure 9). Ainsi, une analyse statistique (Figure 10) montre que les CR IIa et b sont les moins conservés chez ces quatre organismes. Les CR les plus conservés sont les CR III et IV qui correspondent aux domaines HKD et aux domaines directement en aval. L'analyse statistique sans les données de la séquence procaryote montre que l'état de conservation est plus élevé entre les trois eucaryotes, aussi divers soient-ils. Ainsi, le CR IVb est conservé à 100 %. Les CR Ia et b sont conservés à 60 et 70 % respectivement, bien au-delà des données comprenant la séquence procaryote.

Nous avons donc vu que les CR IIa et b sont les moins conservés et dans ce cas-ci on ne note que peu de divergences entre eucaryote et procaryote. De même, les CR IIIa et b présentent peu de divergences entre les quatre organismes et contiennent entre 50 et 60 % d'identité.

Nous verrons au cours de ce travail de thèse que d'autres séquences consensus existent chez les PLD. De fait notre recherche basée sur l'isoforme α des PLD végétales nous poussera à établir des critères de sélection afin de définir cet isoforme par rapport aux autres. Plus largement, il s'agit aussi d'actualiser les données présentées ci-dessus en tenant compte des progrès de la technique et de l'avancée de nos connaissances sur ces enzymes en définissant de nouveaux CR dans les PLD du vivant.

1.3.3.2. Les PLD sans motifs HKD

Ces enzymes qui possèdent une activité PLD n'ont pourtant aucune similarité structurale ou séquentielle avec les PLD de type HKD. Chez les bactéries, le représentant typique est la PLD de *Streptomyces chromofuscus*, une enzyme commerciale possédant une activité PLD en tous points identiques à celle des PLD HKD avec une réaction d'hydrolyse et de transphosphatidylaton. Elle est activée par des ions métalliques (Fe^{3+} , Mn^{2+}) indispensables à son activité catalytique et par le produit de sa réaction : le PA (Selvy et al., 2011). Chez les bactéries, ces enzymes sont des facteurs de virulence et on retrouve les mêmes propriétés chez les PLD d'*Arcanobacterium* et de *Corynebacterium* qui sont, elles, des sphingomyélinases D. Elles catalysent l'hydrolyse de la sphingomyéline permettant la libération de la choline et du céramide-1-phosphate. À titre de comparaison, les sphingomyélinases classiques hydrolysent la sphingomyéline en libérant la phosphocholine et le céramide.

Chez les eucaryotes, les PLD d'araignée possèdent une certaine homologie avec les PLD bactériennes décrites précédemment. Dépourvues elles aussi de motifs HKD, ce sont des sphingomyélinases D. Ces enzymes sont le composant majeur du venin d'araignée du genre *Loxosceles* impliqué dans la dermonécrose et l'hémolyse, symptômes du loxoscelisme, ou la dérégulation de l'activation des neutrophiles (Tambourgi et al., 1998). Cette enzyme chez *Loxosceles intermedia* ainsi que celle de *Sicarius terrosus* ont une structure définie et considérablement différente des enzymes HKD (cf. 1.3.3.6. La structure des PLD).

Chez l'Homme, certaines protéines peuvent être reliées à la catégorie des PLD non-HKD.

Le cytochrome P450 1A2 et 2E1 possède une activité PLD et hydrolyse la PC en plus de l'activité monooxygénase habituelle de cette classe d'enzymes. Il semble que l'activité PLD soit accessoire et fortement activée par la présence de lyso-PS (Cho et al., 2008).

La GPI-PLD hydrolyse le glycosyl-PI libérant l'inositolphosphoglycane et le PA. Son activité est Zn^{2+} dépendante (Selvy et al., 2011). La NAPE-PLD, enzyme dont la structure est connue (Tableau 1 et Figure 13) hydrolyse la N-acyl-PE (NAPE) et génère ainsi la N-acyléthanolamine (NAE) et le PA. Cette enzyme possède deux atomes de zinc dans sa structure et partage un repliement commun avec les membres de sa famille qui comprennent des métalloenzymes et des β -lactamases. Cette PLD ne réalise pas de transphosphatidylaton. Lors de l'hydrolyse des NAPE, si le groupement acyl est un arachidonate, le NAE généré est un anandamide (N-arachidonoyléthanolamide) qui est un agoniste des récepteurs cannabinoïdes CB1 et 2 dans le

système nerveux central notamment. Cette enzyme est donc centrale dans le métabolisme car la signalisation endocannabinoïde est impliquée dans la nociception, l'apprentissage et la mémoire (Okamoto et al., 2009).

L'autotaxine ou ATX (Tableau 1 et Figure 13) est une enzyme de la famille des nucléotides pyrophosphatase/phosphodiesterase. C'est une lyso-PLD qui hydrolyse les groupements polaires des lysophospholipides et génère le lyso-PA. Elle possède elle aussi, deux cations divalents Zn^{2+} , mais contrairement à la NAPE-PLD, elle peut catalyser une réaction de transphosphatidyltion. Elle peut surtout utiliser le groupement hydroxyle libre en *sn*-2 du LPA pour générer un LPA cyclique dont l'action est notamment rapportée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, de l'invasion tumorale et de la métastase (Tsuda et al., 2006).

1.3.3.3. Mécanisme catalytique des PLD

Le mécanisme catalytique de la PLD sera décrit pour le cas de l'hydrolyse de la PC. Il s'agit du même mécanisme quel que soit le phospholipide ou le second substrat. Si ce second substrat est une molécule d'eau il s'agit d'une réaction d'hydrolyse (décrite ici) ; si ce substrat est un alcool primaire, il s'agit d'une réaction de transphosphatidyltion. Les étapes mécanistiques demeurent identiques.

La réaction enzymatique s'effectue en deux étapes. Au cours de la catalyse, le substrat se fixe au sein du site actif et subit une attaque nucléophile ; le groupement polaire (premier produit) est alors partant. Un second substrat, l'eau, provoque une deuxième attaque nucléophile libérant le second produit de la catalyse (PA). Ainsi, la PLD catalyse l'hydrolyse des phospholipides selon un mécanisme de type S_N-2 ou qualifié de "ping-pong" (Figure 11).

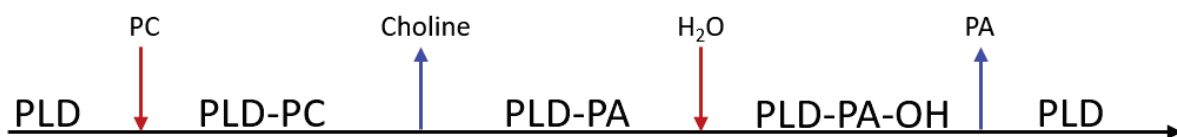


Figure 11 : Mécanisme réactionnel de type « ping-pong » de la PLD

Les flèches en rouge indiquent l'introduction des substrats par attaque nucléophile. Les flèches en bleu indiquent la libération des produits de la réaction.

Tout d'abord, le groupement phosphate du glycérophospholipide subit une attaque nucléophile de l'histidine du motif catalytique HKD N-terminal (Motif N, Figure 12, étape 1) et forme un intermédiaire covalent phospho-histidine (Figure 12, étape 2). L'histidine du second motif (motif C, Figure 12) agit comme un acide et fournit un proton au groupement polaire partant du glycérophospholipide ce qui permet la formation d'un nouvel intermédiaire covalent

phosphatidyl-PLD (Figure 12, étape 2 et 3). La déprotonation de l'histidine C-terminale potentialise l'attaque nucléophile par une molécule d'eau sur le groupement phosphate de l'intermédiaire covalent formant ainsi un intermédiaire PLD-PA (Figure 12, étape 4). Un réarrangement électronique spontané sur l'histidine du motif HKD N-terminal conduit à la libération du PA et la régénération du site catalytique (Figure 12, étape 4 et 1) (Leiros et al., 2004; Selvy et al., 2011).

Dans les structures existantes, l'histidine catalytique du premier motif HKD adopte deux positions consécutives. Dans un premier temps, elle pointe vers l'extérieur ce qui permettrait l'entrée du substrat dans le site actif. Ce dernier serait ensuite « verrouillé » par le remplacement de l'histidine vers l'intérieur du site catalytique. Dans cette seconde position, elle est alors à une distance favorable de l'aspartyl pouvant la stabiliser. Le mécanisme catalytique est ainsi possible. En fin de catalyse, l'histidine retourne à sa position de départ tournée vers l'extérieur du site, ce qui aiderait au départ du PA.

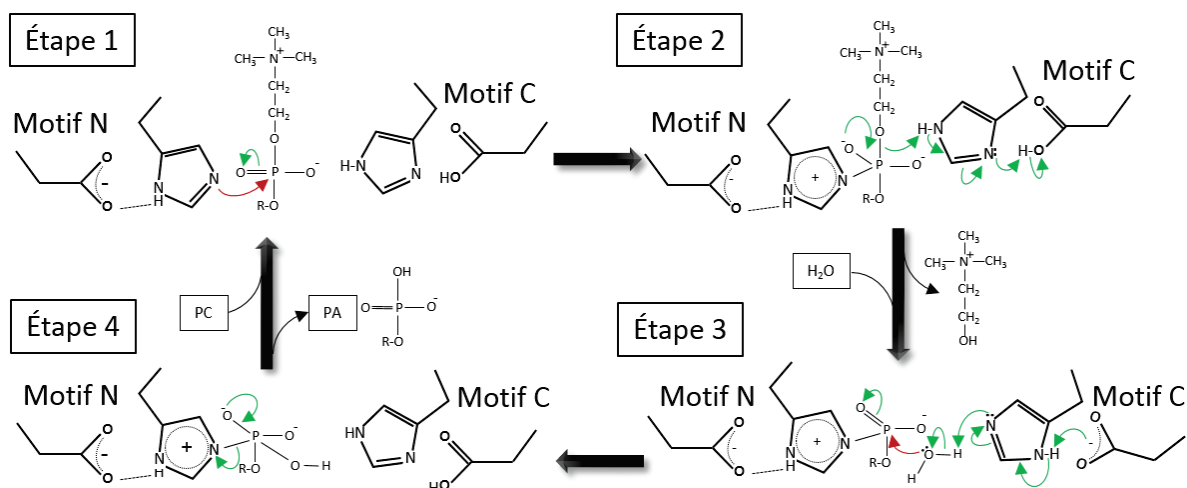


Figure 12 : Mécanisme catalytique des PLD.

Les flèches en rouge sont les attaques nucléophiles et les flèches en vertes sont les réarrangements électroniques spontanés. Motif N : motif HKD N-terminal ; Motif C : Motif HKD C-terminal. Étape 1) L'attaque nucléophile de l'histidine du premier motif HKD provoque un réarrangement de la structure du groupement phosphate du substrat. Étape 2) L'histidine du second motif HKD donne un proton au groupement polaire partant du glycérophospholipide et permet la formation d'un nouvel intermédiaire covalent phosphatidyl-PLD. En parallèle, l'aspartate stabilisant cette histidine fournit un proton pour stabiliser le réarrangement électronique du résidu. Étape 3) L'atome d'azote déprotoné potentialise l'attaque nucléophile par une molécule d'eau sur le groupement phosphate de l'intermédiaire covalent ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire PLD-PA. Étape 4) Un réarrangement spontané sur l'histidine du motif HKD N-terminal conduit à la libération du PA et le retour de l'enzyme à son état basal.

Notons ici que ce modèle présenté ci-dessus est le modèle accepté et largement publié dans la littérature. Il se fonde sur des données théoriques validées ensuite par une étude principalement,

celle de la cristallisation de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF avec des molécules comme de la PC ou du tungstate (Leiros et al., 2004). Une étude biophysique plus récente confirme la présence d'un intermédiaire covalent et donc le mécanisme « ping-pong » à deux étapes (Orth et al., 2010). Ceux-ci proposent d'ailleurs que l'étape limitante de la catalyse n'est plus la formation de l'intermédiaire phosphatidyl-enzyme (Figure 12, étape 2) comme le défendait jusque-là la littérature (Yang and Roberts, 2003) mais la seconde attaque nucléophile.

Cependant, une étude plus ancienne rapporte que l'histidine catalytique serait celle du second motif HKD. En 1999, une équipe japonaise clone la PLD de *Streptomyces antibioticus*. Cette enzyme bactérienne est une PLD à motifs HKD et les auteurs proposent de vérifier quelle histidine fixe l'intermédiaire covalent (Iwasaki et al., 1999b). Pour cela, ils clonent l'enzyme en deux fragments séparés portant chacun un motif HKD et montrent deux choses :

- d'une part, les fragments n'ont pas d'activité PLD individuellement, mais la réunion des deux fragments en solution permet de former une protéine active, constatation qui avait déjà été effectuée avec la PLD de rat un an auparavant (Xie et al., 1998) ;
- d'autre part, en utilisant la méthode du zymogramme avec un substrat portant l'étiquette fluorescente NBD (7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol), substrat nommé NBD-PC (1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-*sn*-glycéro-3-phosphocholine), ils bloquent la configuration de l'intermédiaire covalent qu'ils séparent ensuite par SDS-PAGE. Ceci leur permet d'observer que la fluorescence est uniquement portée par le fragment portant le second motif HKD et qu'ainsi l'histidine du second motif est responsable de l'attaque nucléophile.

Une autre preuve apportée en 1999 montre que l'histidine catalytique qui fixerait la PC et constituerait l'intermédiaire covalent serait celle du second motif HKD dans la PLD humaine. Cependant, en réalité, aucune information ne permet aux auteurs de trancher entre l'une ou l'autre histidine du site actif (Frohman et al., 1999).

Au vu du rôle central des deux motifs HKD dans la catalyse, les PLD sans motif HKD fonctionnent différemment. Le motif catalytique est très différent du motif HKD et il semble que la catalyse requiert la présence d'ions métalliques. La PLD de *Streptomyces chromofuscus*, PLD de bactérie sans motifs HKD, possède en effet un ion manganèse et un ion fer dans sa structure. Peu d'études sur leur mécanisme catalytique existent, mais on notera une étude par mutagenèse dirigée des résidus impliqués dans la fixation des ions métalliques déterminés par homologie de séquence avec des protéines de la superfamille des PAP (*Purple Acid*

Phosphatase) (Zambonelli et al., 2003). Il semble néanmoins que les PLD sans motifs HKD catalysent l'hydrolyse des phospholipides en une seule étape. Le substrat subit une attaque nucléophile directe de la part de l'eau ou de l'alcool primaire (Yang and Roberts, 2003).

Leur mode d'action interfaciale s'apparente alors au « *hopping mode* » dans lequel l'activité ne dépend pas de l'adsorption à l'interface mais de l'accessibilité du substrat, contrairement aux PLD à motifs HKD qui adoptent le « *scooting-mode* » dans lequel l'enzyme s'active à l'interface membranaire avant de catalyser sa réaction.

1.3.3.4. Spécificité de substrat des PLD

Les PLD agissent essentiellement au niveau de l'interface membranaire. Ceci constitue deux de leurs principales particularités :

- Le substrat des PLD est insoluble, ainsi la cinétique enzymatique n'obéit pas au modèle de Michaelis-Menten puisqu'il s'agit d'une enzymologie de type interfacial avec une étape d'adsorption de l'enzyme à l'interface lipidique ;
- Contrairement aux PLD de mammifères qui sont membranaires, les PLD végétales, bactériennes, de levures et virales sont, elles, solubles. Ceci signifie qu'elles passent d'un état soluble dans le cytosol à un état partiellement insoluble lorsqu'elles entrent en contact avec les phospholipides de la membrane. Ainsi, elles portent dans leur structure 3D une composante hydrophobe non négligeable pour interagir avec la membrane.

Les PLD présentent une certaine spécificité de substrat. Ainsi, les PLD végétales à travers la PLD de soja et de tournesol ont une action préférentielle sur la PC puis la PE et le PG à des niveaux équivalents et enfin une action beaucoup plus faible sur le PI et la PS (Abdelkafi and Abousalham, 2011). La même spécificité est observée pour la PLD bactérienne à motif HKD (Matsumoto and Sugimori, 2015). Les PLD de venin d'araignées ont une activité sur la sphingomyéline spécifiquement, puis sur les lyso-PC et lyso-PE, mais aussi le céramide phosphoéthanolamine (Lajoie et al., 2015). La PLD humaine a une action préférentielle sur la PC mais est aussi capable d'hydrolyser les autres phospholipides (Waite, 1999).

On note que la spécificité de l'activité PLD suit la répartition des phospholipides dans la membrane. Il y a une préférence globale pour la PC qui est le phospholipide majoritaire.

1.3.3.5. Méthodes de mesure de l'activité PLD

Il y a deux façons de mesurer l'activité de la PLD :

- On peut mesurer directement la quantité de PA libérée qui est un produit insoluble dans un milieu aqueux ;
- On peut mesurer indirectement la quantité de la tête polaire libérée qui est soluble et, dans la majorité des cas, est la choline.

Nous décrirons ici deux tests enzymatiques couramment utilisés et repris dans ces travaux, puis nous mentionnerons rapidement d'autres tests utilisés dans la littérature.

1.3.3.5.1. Test colorimétrique

L'un des tests de mesure de l'activité PLD les plus courants est la mesure du suivi par absorbance de la libération de la choline. Au cours de ce test couplé, développé en 1977, la choline libérée sous l'action de la PLD sur les phospholipides est oxydée par la choline oxydase ce qui conduit à la formation d'une molécule de H_2O_2 ainsi que de bétaine. L' H_2O_2 est un substrat de la peroxydase qui, en présence du 4-aminoantipyrine et du phénol, conduit à l'apparition d'un chromogène rouge/rosé quinonéimine absorbant à 500 nm (Takayama et al., 1977). Les auteurs testent un sérum et cherchent alors à déterminer quels phospholipides le composent. Ils se servent de la PLD pour libérer la choline et caractériser la présence de PC. Rapidement par la suite, ce test a été utilisé dans les mêmes conditions pour mesurer l'activité PLD (Imamura and Horiuti, 1978).

Peu de temps après, pour augmenter la sensibilité du test, le phénol est remplacé par l'acide 3,5-dichlorobenzenesulfonique (DCBS) (Artiss et al., 1979), puis par l'acide 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzenesulfonique (HDCBS). Le groupement quinonéimine rouge/rosé (N-(4-anipyril)-3-chloro-5-sulfonate-p-benzoquinone-monoimine) formé est alors le même (Taylor et al., 1982).

Une autre technique, moins usitée cependant, consiste à utiliser l'enzyme glycérol oxydase pour générer l' H_2O_2 à partir de la molécule de glycérol libérée (Uwajima et al., 1980). Ainsi, avec les mêmes réactifs chromogéniques que précédemment (4-aminoantipyrine et HDCBS) l'activité de la PLD sur le PG peut être mesurée (Sato et al., 2000).

1.3.3.5.2. Test fluorimétrique

Alors qu'ils cherchent à mesurer l'activité de la monoamine oxydase de la mitochondrie, des chercheurs utilisent une sonde qui permet la détection de l' H_2O_2 . Ce dernier peut être généré suite à l'oxydation de la choline, produit de dégradation de la PC par la PLD, par la choline

oxydase. La réduction de l' H_2O_2 par la peroxydase en présence de l'*Amplex Red* (N-acétyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) génère la résorufine dont la fluorescence peut être suivie à 585 nm (Zhou and Panchuk-Voloshina, 1997). Néanmoins, ce test fluorescent commercialisé ne peut être utilisé que dans le cas où le substrat de la PLD est la PC. Plus récemment, un autre test fluorescent a été mis au point au laboratoire (Rahier et al., 2016b). Il permet de quantifier directement le PA libéré sous l'action de la PLD sur les phospholipides. Ce test utilise une sonde, la 8-hydroxyquinoléine (8-HQ), dont la fluorescence basale est augmentée par chélation avec le PA *via* les ions Ca^{2+} . Il s'agit du phénomène CHEF (*Chelation Enhanced Fluorescence*). Ce test direct et continu peut être utilisé pour analyser la spécificité de substrat des différentes PLD.

1.3.3.5.3. Autres tests

L'utilisation de phospholipides radiomarqués est très courante pour mesurer des activités PLD faibles comme l'est celle de la PLD humaine. Cette méthode *in vitro* discontinue, longue et fastidieuse suppose l'extraction des phospholipides à la fin de la réaction, leur migration et leur séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) puis le comptage de la radioactivité des produits de la réaction. *In vivo*, cette méthode est applicable en incorporant des acides gras radiomarqués qui seront métabolisés au sein des phospholipides. L'ajout d'un alcool primaire permettra ensuite de générer des phosphatidylalcools par la réaction de transphosphatidylatation catalysée par la PLD (Randall et al., 1990).

L'utilisation de substrats synthétiques comme le NBD-PC ou le phosphatidyl-*p*-nitrophénol est d'usage elle aussi et permet la détection du NBD-PA ou du *p*-nitrophénol respectivement.

Enfin, on notera, entre autres tests, plusieurs mises au point pour détecter la présence du PA. Le phosphate organique peut être dosé après libération par la phosphatase alcaline à partir du PA (Martin et al., 2000), ou bien par la différence d'absorbance des phospholipides dans l'infrarouge (Do et al., 2012).

1.3.3.6. La structure des PLD

1.3.3.6.1. La relation structure-fonction

La résolution structurale d'une protéine est un enjeu important pour comprendre l'organisation spatiale des atomes de chaque acide aminé dans un espace tridimensionnel. Deux dogmes

majeurs dominant dans ce domaine : un dogme structure-séquence et un dogme structure-fonction. Le premier attribue une structure unique à une séquence peptidique. Celui-ci est désormais largement discuté notamment depuis les travaux de Stanley Prusiner (Prix Nobel 1997) sur la protéine Prion en 1982 (Prusiner, 1982) démontrant qu'une protéine peut adopter plusieurs conformations sans l'aide d'un facteur extérieur. De fait la protéine Prion existe sous deux formes structurales avec la même séquence peptidique : PrP^C et PrP^{Sc}.

Le second dogme relie la fonction des protéines à leur structure. La notion de dualité structure-fonction trouve ses origines dans deux postulats majeurs. Le premier date de la fin du XIX^{ème} siècle avec le modèle « clé-serrure » établi par Emil Fisher en 1894. Ce modèle, qui définit le concept d'interaction enzyme-substrat, permet aussi de postuler, à l'époque, cette dualité entre la séquence peptidique et la fonction unique de la protéine. Ce dogme a été d'autant plus accepté lors de la publication des travaux de Christian Anfinsen (Prix Nobel 1972) qui étudie la ribonucléase dans les années 1960. Il montre que l'enzyme dénaturée au contact de l'urée perd son activité catalytique. Activité qui est restaurée lorsque l'urée est retirée de la solution. Cette expérience lui permet de relier directement la fonction de l'enzyme à sa structure (Anfinsen et al., 1961).

Ce second dogme a rapidement lui aussi été très discuté. Progressivement beaucoup d'études ont pointé des protéines dont la structure pouvait changer au contact d'une molécule particulière.

Aujourd'hui l'idée de zones non structurées dans les protéines est établie et on peut distinguer trois cas d'organisation peptidique :

- Les protéines qui répondent au modèle « clé-serrure » (*lock and key*) de Fisher. L'enzyme se replie dans une conformation unique qui permet une fixation parfaite du substrat ;
- Les protéines qui répondent au modèle « serrure-clé » (*fold as you bind*). Celles-ci prennent la forme du substrat qu'elles vont fixer. Ce modèle est un dérivé de la théorie démontrée expérimentalement, de l'ajustement induit (*induced fit*) établit par Daniel Koshland (Koshland, 1994) ;
- Les protéines intrinsèquement non structurées (*shape shifting*) qui vont adopter plusieurs conformations possibles au contact d'un partenaire. (Chouard, 2011)

Notons que les deux premiers cas respectent le dogme structure-fonction mais s'affranchissent du dogme structure-séquence, là où le troisième s'affranchit des deux.

1.3.3.6.2. Méthodes de résolutions

1.3.3.6.2.1. Méthodes à haute résolution

Plusieurs techniques existent pour résoudre la structure 3D d'une protéine.

La plus utilisée aujourd'hui est la cristallographie qui consiste à influencer la précipitation de la protéine vers la formation d'un cristal au sein duquel celle-ci est ordonnée et périodique. La diffraction de ce cristal par des rayons X permet d'obtenir une carte de densité électronique représentative de la position de chaque atome dans l'espace.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique qui permet de déterminer les distances interatomiques. Après attribution des acides aminés correspondants, cette technique permet d'obtenir la structure 3D de petites protéines (jusqu'à 30 kDa). Elle est aussi représentative de la dynamique et du mouvement interne des éléments de la protéine.

La microscopie électronique utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon figé congelé de protéines (Cryo-EM). L'observation sous différents angles de la protéine permet d'obtenir sa structure 3D néanmoins, ceci est aujourd'hui valable pour les virus, les gros complexes multimériques ou les protéines de plus de 150 kDa.

Parmi ces trois techniques la cristallographie demeure la plus puissante et la plus résolutive pour obtenir la structure de protéines de taille moyenne (90 kDa) comme la PLD. Cependant, il faut noter que dans le cas de la cristallographie et de la microscopie électronique, les échantillons observés sont figés et seuls des outils de modélisation vont pouvoir rendre compte de la dynamique moléculaire, ce qui n'est pas le cas de la RMN. Enfin, la cristallographie est grandement limitée par la formation de cristaux, élément indispensable à l'obtention d'une structure haute résolution.

1.3.3.6.2.2. Méthode à basse résolution

D'autres techniques existent pour suivre le repliement, la dynamique moléculaire ou les changements de structures dans certaines conditions comme la diffusion des rayons X aux petits angles ou SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*). Il s'agit alors de faire diffuser des rayons X à travers une solution de protéines. Mais cette technique ne permet pas d'atteindre une résolution suffisante pour placer les atomes de la protéine dans un espace tridimensionnel. Elle permet seulement d'obtenir un modèle de l'enveloppe de la protéine en solution. Par ailleurs, cette

technique est aussi utilisée pour l'étude de processus cinétiques, de transition structurale, de changements conformationnels en réponse à des variations de paramètres.

1.3.3.6.3. Structures résolues dans la superfamille de PLD

L'état des lieux des structures 3D des membres de la superfamille de PLD est résumé dans le tableau 1.

Le premier représentant de la superfamille des PLD dont la structure a été obtenue est la nucléase Nuc. Celle-ci s'apparenterait à une demi-PLD puisqu'elle ne possède qu'un motif HKD (Stuckey and Dixon, 1999). Peu de temps après a été publiée la structure de la PLD procaryote de *Streptomyces sp.* PMF (Leiros et al., 2000).

Cette structure, comme celle de Nuc, contient un repliement typique nommé « repliement α/β -hydrolase » qui consiste en un feuillet β constitué de brins parallèles entourés d'hélices α dans une topologie en sandwich α - β - α - β . Ce repliement est commun à d'autres enzymes lipolytiques, hydrolytiques mais aussi des estérases. La forme globale de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF est une structure bilobée en forme de selle à cheval avec dans son creux la réunion des deux motifs HKD (Figure 13D).

La structure de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF a ensuite été étudiée pour déterminer le mécanisme d'action des PLD. Une structure existe donc avec en son sein un noyau tungstate (analogue du groupement phosphate et inhibiteur de l'enzyme), un 1,2-dibutyryl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine ou encore un glycérophosphate (tous deux analogues du substrat) (Tableau 1) afin de mettre en évidence l'intermédiaire covalent phosphatidyl-enzyme (Leiros et al., 2004).

Les autres structures existantes appartiennent à des PLD qui ne possèdent pas de motif HKD et dont la structure est considérablement différente. Il s'agit d'enzymes d'araignées du génus *Loxosceles* principalement (*Loxosceles intermedia* et *laeta*) ou *Sicarius terrosus*. En réalité, ces enzymes possèdent une activité sphingomyélinases D. De même la NAPE-PLD humaine est une PLD sans motifs HKD. Ces enzymes ont une structure constituée d'un feuillet β replié de façon circulaire formant un canal entouré d'hélices α (Figure 13A et B).

Tableau 1 : Structures résolues des phospholipases D.

DBPC : 1,2-dibutyryl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine. AG : acide gras. GlycéroP : glycéro-phosphate.
 myo-inositol1P : D- myo-inositol-1-phosphate. Anti-ATX : aptamère d'ADN inhibiteur de l'ATX.

Enzyme	Organisme	Code PDB	Résolution	Référence
PLD	<i>Streptomyces sp.</i> PMF	1F0I	1,9 Å	(Leiros et al., 2000)
PLD	<i>Streptomyces sp.</i> PMF	1 V0S	1,75 Å	(Leiros et al., 2004)
PLD + tungstate	<i>Streptomyces sp.</i> PMF	1V0R	1,7 Å	(Leiros et al., 2004)
PLD + DBPC	<i>Streptomyces sp.</i> PMF	1V0Y/ 1V0W / 1V0V	1,71 Å / 1,35 Å / 1,7 Å	(Leiros et al., 2004)
PLD + glycéroP	<i>Streptomyces sp.</i> PMF	1V0T / 1V0U	1,53 Å / 1,42 Å	(Leiros et al., 2004)
PLDα2	<i>Brassica oleracea</i>			(Stumpe et al., 2007)
Nuc	<i>Salmonella typhimurium</i>	1BYR/1BYS	2,0 Å	(Stuckey and Dixon, 1999)
PLD	<i>Streptomyces antibioticus</i>	2ZE4	3,0 Å	Suzuki <i>et al.</i> 2007 unpublished
PLD + PC	<i>Streptomyces antibioticus</i>	2ZE9	2,3 Å	Suzuki <i>et al.</i> 2007 unpublished
PLD	<i>Loxosceles intermedia</i>	3RLH	1,72 Å	(De Giuseppe et al., 2011)
PLDmut + AG	<i>Loxosceles intermedia</i>	3RLG	1,6 Å	(Ullah et al., 2011)
PLD + myo-inositol1P	<i>Loxosceles intermedia</i>	4RW3	1,72 Å	(Coronado et al., 2015)
PLDmut + AG	<i>Loxosceles intermedia</i>	4RW5	1,64 Å	(Coronado et al., 2015)
NAPE-PLD	<i>Homo sapiens</i>	4QN9	2,65 Å	(Magotti et al., 2015)
PLD beta	<i>Sicarius terrosus</i>	4Q6X	2,14 Å	(Lajoie et al., 2015)
Sphingomyelinase D	<i>Loxosceles laeta</i>	2F9R	1,85 Å	(Murakami et al., 2006)
ATX	<i>Rattus norvegicus</i>	2XR9 / 2XRG	2,05 Å / 3,2 Å	(Hausmann et al., 2011)
ATX + Anti-ATX	<i>Mus musculus</i>	5HRT	1,99 Å	(Kato et al., 2016)
ATX	<i>Rattus norvegicus</i>	5L0B	2,41 Å	(Jones et al., 2016)

Il existe aussi plusieurs structures de l'autotaxine (ATX) qui est une lyso-PLD sans motifs HKD. Celle-ci, au contraire des précédentes, partage des caractères structuraux avec la PLD procaryotes et son repliement bilobé est relativement similaire (Figure 13C).

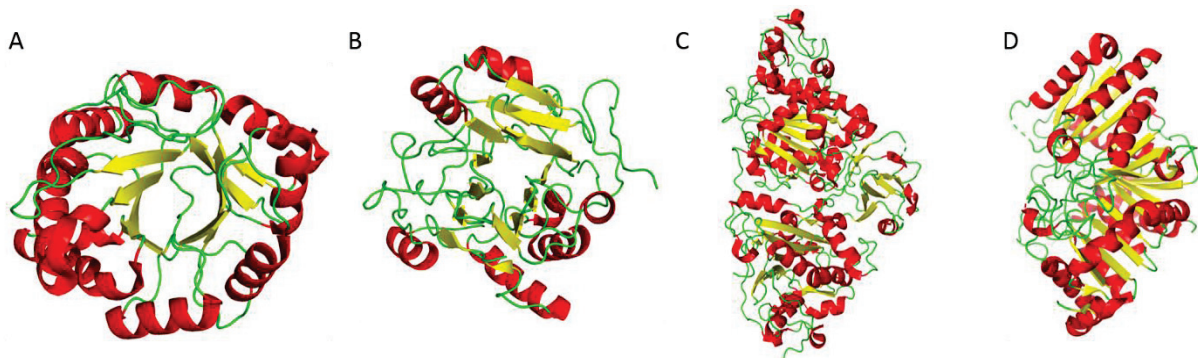


Figure 13 : Structures des membres de la superfamille des PLD.

A) Structure de la PLD non HKD de *Loxosceles intermedia* (3RLH). B) Structure de la NAPE-PLD d'*Homo sapiens* (4QN9). C) Structure de l'ATX de *Rattus norvegicus* (5L0B). D) Structure de la PLD de *Streptomyces sp. PMF* (1F0I). Les hélices α sont représentées en rouge, les brins β sont en jaune et les boucles sont en vert.

En réalité la seule information structurale que nous possédons sur les PLD eucaryotes provient d'un modèle de la PLD α 2 de chou (*Brassica oleracea*) à basse résolution obtenue par la méthode de SAXS (Stumpe et al., 2007). L'enzyme est alors décrite comme structurée en tonneau avec des extrémités lâches. L'une des deux extrémités étant supposée être le domaine régulateur C2 (Figure 14).

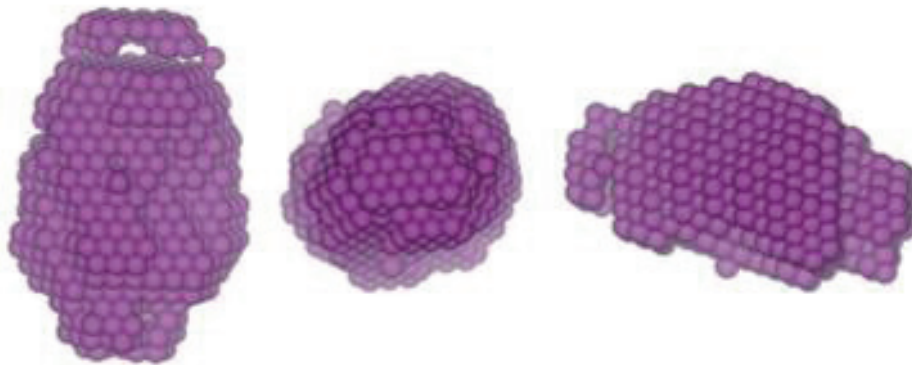


Figure 14 : Modèle SAXS de la PLD α 2 de chou.

Les modèles sont présentés dans trois vues différentes obtenues par rotation de 90° autour de l'axe des ordonnées (milieu) et de l'axe z (à droite) (Stumpe et al., 2007).

Précisons ici que la présence des deux domaines HKD au sein de la structure primaire de l'enzyme permet la formation d'un seul motif catalytique par la réunion de ces deux motifs. Il est donc faux de penser que la présence de ces deux motifs procure deux sites catalytiques aux PLD.

1.3.3.7. Cofacteurs des PLD

Pour les PLD végétales, le Ca^{2+} est un cofacteur nécessaire à l'activité enzymatique (Pappan et al., 1997). D'autres cofacteurs métalliques, et notamment des cations divalents, existent pour les PLD, notamment celles qui n'ont pas de motifs HKD comme la PLD de *Streptomyces chromofuscus* qui fixe un atome de manganèse et de fer dans son site actif (Zambonelli et al., 2003) ou la PLD humaine qui nécessite des ions magnésium et calcium (Brown et al., 1995).

Au niveau protéique, on notera l'interaction de la PLD végétale avec la cardosine A rapportée au cours d'une étude du domaine C2 (Simões et al., 2005). Cette interaction serait responsable du clivage du domaine C2 selon les auteurs. Une partie de nos travaux de recherche s'attachera à caractériser ce clivage caractéristique des PLD végétales par ailleurs. L'interaction des PLD α végétales au niveau du motif DRY avec une protéine G a été aussi rapportée (Zhao and Wang, 2004). La PLD α semble réguler l'activité GTPase et la localisation de la protéine G. Enfin, comme les PLD humaines, la PLD végétale interagit avec l'actine dans un mécanisme de régulation réciproque. L'actine peut moduler l'activité PLD alors que celle-ci permet la polymérisation de l'actine (Pleskot et al., 2010).

La PLD humaine est activée par des petites protéines G de la famille Rho, Arf, Ral ou Rac qui ont un rôle régulateur de l'activité PLD (Abousalham et al., 1997b, 2002). Elle interagit aussi avec la PKC α qui semble stimuler l'activité PLD1 en phosphorylant des résidus sérils et threonyls. On trouve parmi les partenaires direct d'interaction des protéines d'ubiquitination ou encore la protéine Grb2, Src ou des caspases dont la PLD1 possède un site de clivage (Lavieri, 2014). La localisation de la PLD1 au voisinage du noyau de la cellule *via* son NLS (*Nuclear Localisation Signal*) serait régulée par l'interaction de celle-ci avec l'importine- β (Jang and Min, 2012).

Les détails de ces interactions et leurs rôles sont repris dans la Figure 15.

1.3.3.8. Rôles physiologiques de la PLD

Les rôles des PLD végétales, de levures et humaines seront approfondis dans ce chapitre, tandis que les rôles des PLD virales et bactériennes seront survolés, ceux-ci ne constituant pas une source d'information pertinente pour notre sujet.

1.3.3.8.1. Chez les végétaux

Dans les plants d'*A. thaliana*, l'acide abscissique (ABA) est une phytohormone produite quand la teneur en eau est faible, ce qui déclenche la fermeture des stomates. L'ABA provoque la translocation de la PLD α aux membranes microsomales. L'inactivation du gène codant la PLD α entraîne une plus grande perte d'eau alors que la surexpression entraîne la fermeture des stomates et donc la rétention de l'eau. De fait, il semble qu'il y ait une augmentation de l'activité PLD en cas de sécheresse (El Maarouf et al., 1999).

Il y a donc un lien entre l'expression de la PLD α et la stimulation par l'ABA. Par ailleurs, l'ABA n'a aucun effet sur les stomates en absence de PLD α et l'ajout du PA entraîne la fermeture des stomates. Le PA produit par la PLD interagit avec la protéine ABI1 phosphatase 2C qui est un régulateur négatif de l'action de l'ABA. Cette interaction inhibe l'action phosphatase de cette protéine en la retenant à la membrane plasmique. De cette façon ABI1 ne peut pas activer ATHB6 qui est un facteur de transcription qui régule négativement l'action de l'ABA. Ainsi, l'action de la PLD *via* la formation de PA permet de favoriser la signalisation de l'ABA (Zhang et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré que la PLD α interagissait avec la sous-unité α des protéines G (Zhao and Wang, 2004) qui jouent, elles aussi, un rôle dans la signalisation de l'ABA.

Chez *A. thaliana*, le PA induit la mort cellulaire en activant la voie de production de dérivés toxiques de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) par la petite protéine G ROP2 (Zhang et al., 2009). Des expériences montrent que sans PLD α il y a moins de production de ROS et que l'ajout de PA permet de retrouver cette production de ROS chez des plantes invalidées pour le gène de la PLD α . Chez la tomate, en présence d'un éliciteur avirulent, le PA induit un stress oxydatif. Ainsi, la PLD α est directement impliquée dans la voie de mort cellulaire par production de ROS

La NADPH oxydase est la source de production des ROS dans la réponse à l'ABA et autres phénomènes (pathogène, croissance de cheveux racinaires). La NADPH oxydase chez les plantes que l'on nomme Rbohs (*Respiratory Burst oxidase homologs*) est activée par le PA libéré par la PLD (Zhang et al., 2009). Ainsi ce processus favorise la formation de ROS sous forme d'H₂O₂ qui inhibe l'activité de ABI1 et favorise ainsi l'action de l'ABA dans la fermeture stomatique.

Enfin, le processus de cicatrisation chez les plantes est connu pour activer la PLD induisant sa translocation vers la membrane plasmique. Elle produit ainsi du PA dont l'une des propriétés est d'activer la PLA₂. L'hydrolyse des lipides en position *sn*-2 permet la libération d'acide gras et notamment de l'acide linoléique, un précurseur de la production d'acide jasmonique par la lipoxygénase 2. Cette hormone va activer des facteurs de transcription et augmenter l'expression de gènes impliqués dans la croissance, la défense et la réparation des plantes (Wang et al., 2000).

1.3.3.8.2. Chez la levure

La PLD de levure SPO14 est une enzyme qui comprend deux motifs HKD et appartient donc à la superfamille des PLD. Elle se distingue de ses homologues en deux points. Tout d'abord elle possède une masse moléculaire plus élevée (195 kDa) puisqu'elle comprend 1683 résidus (Rose et al., 1995). Ensuite elle se distingue par sa séquence N-terminale appelée LOCO/phos. Il s'agit d'un motif de 313 résidus ayant pour rôle la localisation et la phosphorylation. En aval de ce domaine se trouvent les domaines PX et PH similaires aux PLD de mammifères (Figure 8). Cette région est en effet hyperphosphorylée sur des résidus séryl et thréonyl, ce qui induit un changement de masse moléculaire conséquent puisqu'elle passe de 195 kDa à 220 kDa. Ce phénomène est nécessaire à son rôle dans la méiose mais pas pour ses autres fonctions cellulaires (Rudge et al., 2002).

Chez la levure, une privation en oxygène ou l'exposition à une source de carbone non fermentable entraîne la sporulation. Ceci permet la formation de noyaux haploïdes après la méiose I et II. Ces noyaux sont ensuite entourés d'une nouvelle membrane PSM (*prespore membrane*). La formation du PSM et l'enveloppement du noyau s'effectuent au niveau du fuseau méiotique et dépendent de SPO14. Celle-ci est transloquée au PSM grâce au domaine PH qui interagit avec le PI-4,5-P₂. Au niveau de la membrane elle produit le PA. Celui-ci augmente l'efficacité par fixation de SPO20 (homologue de la protéine SNAP-25 pour *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*), une protéine ancrée à la membrane responsable de la fusion des membranes (Nakanishi et al., 2004).

SPO14 est aussi impliquée dans les voies métaboliques du croisement entre levures. La kinase Ste20p est responsable de la formation du shmoo (protubérance avant le croisement entre les levures). Elle déclenche la formation du complexe protéique appelé le polarisome qui facilite

la polarisation des cellules et le réarrangement du cytosquelette d'actine. La production de PA par SPO14 entraîne l'activation de Ste20p (Harkins et al., 2008).

Enfin, l'homologue de SPO14 chez *Candida albicans* (PLD1) agit comme facteur de virulence responsable de la transition morphogénique entre la forme levure et hyphale. C'est cette dernière forme qui provoque l'invasion tissulaire et la pénétration des cellules épithéliales (McLain and Dolan, 1997).

Notons ici qu'une PLD similaire à SPO14 existe dans la « levure à fission » *Schizosaccharomyces pombe*. Celle-ci possède une masse moléculaire moins élevée (157 kDa) et n'est pas activée par le PI-4,5-P₂ (Harkins et al., 2010).

Pour être complet, une seconde activité PLD a été détectée chez *S. cerevisiae*, mais les propriétés biochimiques de celles-ci ne la classent pas dans la superfamille des PLD. De fait elle est calcium dépendante, PI-4,5-P₂-indépendante et surtout ne possède pas de motifs HKD ni ne catalyse de réaction de transphosphatidylolation (Waksman et al., 1997).

1.3.3.8.3. Chez les mammifères

La PLD humaine sera prise comme un exemple de l'impact de la PLD et de ses isoformes sur un métabolisme mammalien.

1.3.3.8.3.1. La PLD humaine

Chez l'Homme on compte six isoformes de la PLD dont la structure primaire est la principale variable. Les PLD1 et 2, qui sont les deux seules isoformes actives *in vitro* et possèdent le domaine PX (phox), qui fixe les phosphoinositides comme le PI-4,5-P₂ (Xu et al., 2001), le PA, interagit avec Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) et est impliqué dans la phosphorylation de la PLD2 (Selvy et al., 2011), PH (*plekstrin homology*) qui fixe les phosphoinositides (Gibson et al., 1994), est responsable de l'interaction de la PLD2 avec la GTPase Rac2 et contient le site d'ubiquitination de la PLD1 (Selvy et al., 2011). Ainsi, la PLD humaine est régulée par de nombreuses protéines partenaires parmi lesquelles on compte les petites protéines G Rho, Ras et Rac ainsi que les PKC. C'est aussi une enzyme PI-4,5-P₂ dépendante.

Les PLD3, 4, 5 et 6 sont transmembranaires et la PLD6 ne contient qu'un seul motif HKD (Selvy et al., 2011).

Les PLD1 et 2 sont ancrées à la membrane *via* deux palmitates situés sur des résidus cystéines du domaine PH. Ces deux enzymes se distinguent par la présence dans la PLD1 d'une boucle régulatrice de 200 résidus. Ainsi, contrairement aux autres PLD du vivant, les PLD de mammifères sont des enzymes membranaires (Bruntz et al., 2014a).

Notons cependant que l'enzyme est toujours active sans les palmitoylations qui l'ancrent dans la membrane. Cela a été démontré avec la PLD1 où les deux résidus cystéines palmitoylés sont mutés. L'enzyme présente deux fois moins d'activité et sa localisation intracellulaire change. Elle demeure localisée à la membrane sans pour autant s'y ancrer, témoignant ainsi de l'affinité des domaines PX et PH pour les phosphoinositides (Sugars et al., 1999).

1.3.3.8.3.2. La PLD et le cancer

Le rôle de la PLD dans le phénomène cancéreux a rapidement émergé. De fait, les cellules cancéreuses possèdent une forte activité PLD et une expression élevée des ARNm codant l'enzyme dans des cellules tumorales du sein, du rein, du système gastrique, de la thyroïde ou du cerveau. De la même façon, la surexpression de PLD augmente la tumorigenèse de cellules en culture (Bruntz et al., 2014a).

Dans le cadre de la prolifération cellulaire, le rôle de la PLD est démontré par l'ajout de PA (produit de la réaction de d'hydrolyse des phospholipides) ou bien de PLD bactérienne exogène qui provoque chez les cellules une augmentation du niveau du facteur de transcription c-Myc et de l'absorption de la thymidine qui sont des marqueurs de la prolifération (Moolenaar et al., 1986).

Ainsi, la PLD1 aurait un rôle dans la viabilité cellulaire, la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses. Elle aurait aussi un rôle dans l'environnement tumoral où elle faciliterait la néoangiogenèse et la métastase (Gomez-Cambronero, 2014).

Une étape importante de la dissémination des cellules métastatiques est la sécrétion de métalloprotéinases (MMPs) qui vont lyser les composants de la matrice extracellulaire et permettre l'invasion des cellules du site primaire vers la circulation. NFκB est un facteur de transcription dont les gènes cibles sont impliqués dans la tumorigenèse et la survie cellulaire. Le promoteur de la PLD1 contient deux sites de fixation à ce facteur de transcription. Le PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) entraîne l'expression de la PLD1 dont le PA produit est déphosphorylé en DG. Le DG active la PKC qui à travers la voie ras/ERK permet la formation du NFκB et la transcription des MMP-9 (Kang et al., 2008) (Figure 15).

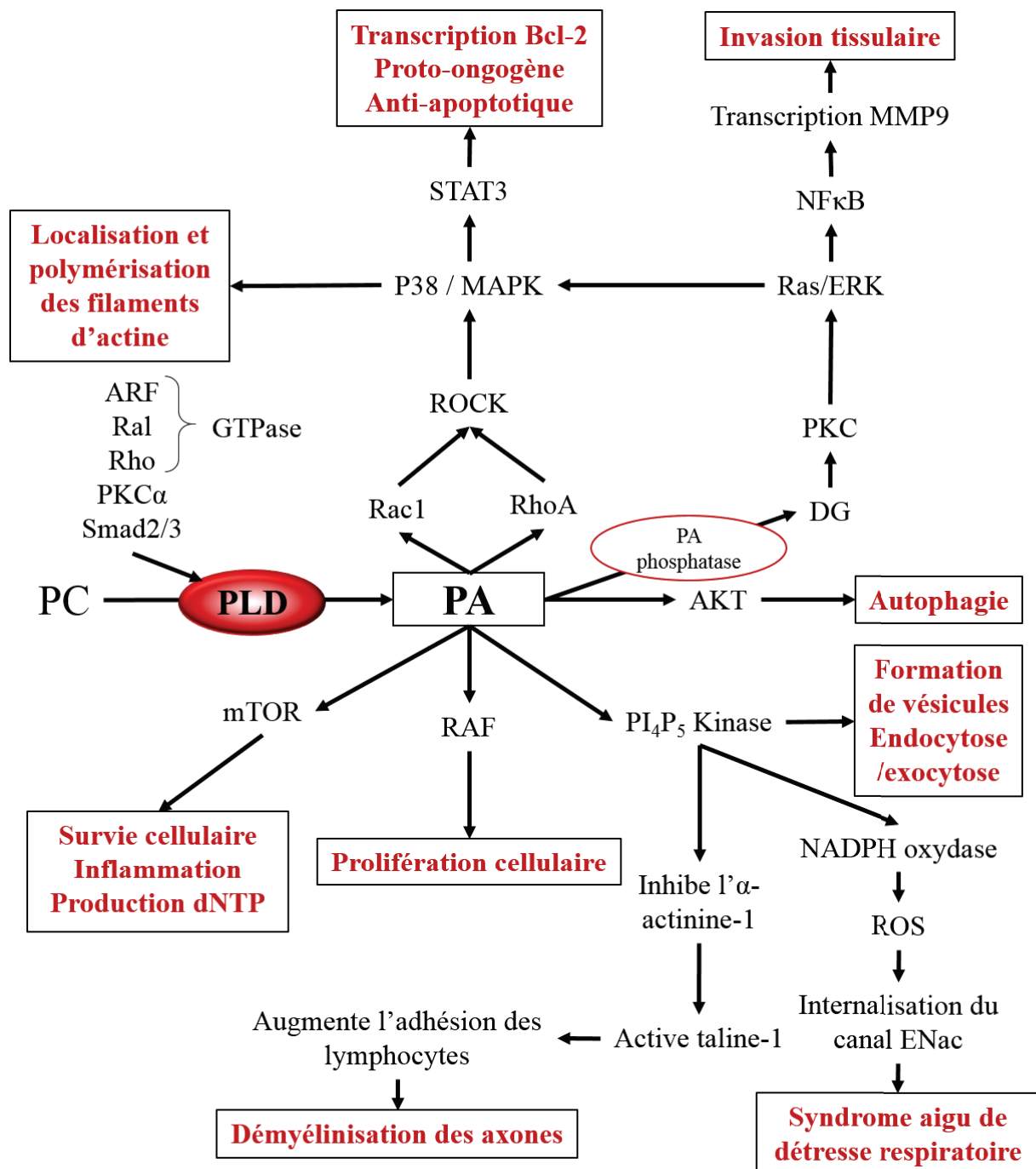


Figure 15 : Voies métaboliques activées par l'action de la PLD chez les mammifères. Les protéines ROCK (*Rho-Associated Protein Kinase*) et RAF sont des kinases. La protéine STAT3 est un facteur de transcription et la protéine Ral est une GTPase.

Initialement les tumeurs s'étendent en utilisant des nutriments diffusés par le système circulatoire et ne sont pas détectables par le système immunitaire. Plus la tumeur s'étend et plus le besoin en nutriment s'accroît ce qui requiert *in fine* que la tumeur soit vascularisée. Ceci augmente ainsi son exposition au système immunitaire. Plusieurs raisons peuvent expliquer le

blocage de croissance d'une tumeur, comme par exemple l'absence de nutriments ou une réponse du système immunitaire. Il a été montré sur les souris que la réponse immunitaire était la même avec les souris de type sauvage et les souris PLD1^{-/-}. Cependant, les tumeurs des souris PLD1^{-/-} montrent une absence de micro-vaisseaux servant à la vascularisation, et ce alors que les tumeurs de souris PLD2^{-/-} ont le même niveau de vascularisation que les souris de type sauvage. Cela indique donc que la PLD1 est impliquée dans le phénomène de vascularisation. En réalité, la mutation PLD1^{-/-} entraîne un déficit en VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) via la voie p38/akt : l'angiogenèse est donc ralentie. La métastase est aussi altérée en l'absence de PLD1 où celle-ci est impliquée dans l'établissement initial des cellules métastatiques (Chen et al., 2012).

L'hormone EGF (*epidermal growth factor*) induit la dimérisation de son récepteur quand elle s'y fixe. Cette dimérisation provoque l'autophosphorylation de plusieurs tyrosines du récepteur qui vont alors former un site pour les domaines SH2 (Src homology 2), notamment ceux des Grb2, de la PLC γ et de la sous-unité p85 de la phosphoinositide 3-kinase. La PLD2 se fixe sur un domaine SH3 de Grb2, cette étape étant particulièrement importante pour son activité catalytique et la formation de PA. Cette étape facilite aussi le recrutement de la *guanine nucleotide-exchange protein* SOS (*son of sevenless*) à la membrane. Ainsi la PLD2 peut activer la RAS GTPase qui active à son tour la RALA GTPase. Cette dernière régule l'activité PLD2. Cette voie RAS bien connue dans l'oncogenèse est donc une cible particulière pour la thérapeutique (Brown et al., 2017).

Dans le cadre du cancer du cerveau, la PLD2 est un régulateur de l'autophagie et de la survie cellulaire. Le PA produit par la PLD2 permet le recrutement à la membrane de la protéine kinase AKT qui sera alors phosphorylée. Celle-ci phosphoryle à son tour la beclin-1, ce qui induit la disruption du complexe beclin1-Rubicon déclenchant le signal d'autophagie. Dans le cadre des cellules de glioblastomes le processus d'autophagie est un mécanisme de défense des cellules cancéreuses pour échapper à la thérapie (Bruntz et al., 2014b).

Le PA active la PI-4,5-P₂ kinase et mTOR pour réguler des processus cellulaires comme l'hypertrophie, la survie, et la différenciation. Le PA peut être déphosphorylé par la lipine pour produire du DG ou hydrolysé par une PLA pour produire du lyso-PA (Bruntz et al., 2014b).

La PLD6 ou mitoPLD est, de son côté, un marqueur du développement du cancer de l'utérus (Nelson and Frohman, 2015).

1.3.3.8.3.3. La PLD et la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson se caractérise par une mort progressive des neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra pars compacta* et la présence d'inclusions cytosoliques appelées les corps de Lewis (LB). L'un des principaux composants des LB est l' α -synucléine, une protéine alors sous une forme mal repliée. La forte présence d' α -synucléine entraîne une diminution de l'expression de PLD1 et altère la voie des MAP kinase (ERK1/2). La capacité de fixation de l' α -synucléine sur l'ADN et son habilité à réguler la transcription permettent de postuler que la dérégulation de l'expression de PLD1 s'effectue au niveau génique. La PLD1 régule la voie des MAPK mais aussi leur localisation dans le cytosol. Cette dérégulation entraîne une perte des neurofilaments d'actine (NFL) dans la cellule, phénomène commun dans les maladies neurodégénératives. Ainsi l'expression du NFL semble régulée par le PA, produit d'hydrolyse des phospholipides membranaires par la PLD1 (Conde et al., 2018).

1.3.3.8.3.4. La PLD et la maladie d'Alzheimer

La PLD3 est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. On note une surexpression dans le cerveau où certains polymorphismes rares sont caractéristiques de l'apparition tardive de la maladie. Son rôle ainsi qu'une potentielle activité PLD demeurent inconnus ; cependant, sa localisation au niveau du réticulum endoplasmique et du système sécrétoire indique qu'elle pourrait nuire à la sécrétion du peptide amyloïde A β , celui-ci s'accumulant alors dans l'endosome précoce, caractéristique de base de la maladie. De fait, on retrouve un polymorphisme associé à l'apparition tardive de la maladie dans lequel un motif d'ubiquitinylation est muté, indiquant que la PLD3 n'est alors pas dirigée vers l'endosome tardif puis le lysosome pour sa dégradation avec le peptide A β .

Comme pour la PLD3, aucune activité catalytique n'a été montrée pour la PLD4. Cependant, celle-ci semble impliquée dans des maladies auto-immunes. Elle est surexprimée dans les macrophages du système immunitaire inné du système nerveux central (SNC). Elle serait impliquée dans la phagocytose des cellules immunitaires et donc dans la mise en place de lésions du SNC. À l'inverse, on note une hyper-activation du système immunitaire lors de l'expression déficiente de cette enzyme (Nelson and Frohman, 2015).

1.3.3.8.3.5. La PLD et la sclérose en plaques

La sclérose en plaques est une maladie auto-immune qui évolue généralement en plusieurs phases. Pendant plusieurs années la phase RRMS (pour *Relapsing-Remission Multiple Sclerosis*) est une alternance de rechutes et de rémissions de la maladie. Cette phase mène progressivement au handicap ou SPMS pour *Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. Cependant, un certain nombre de patients montrent une condition détériorée stable : PPMS pour *Primary Progressive Multiple Sclerosis*. Dans la phase RRMS, l'expression de la PLD 1 est beaucoup moins importante chez les sujets atteints que chez les sujets sains (Eftekharian et al., 2017).

En conditions inflammatoires comme dans le cadre de la sclérose en plaques, les cellules immunitaires peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et induire la démyélinisation des axones. Il semblerait que la PLD1 soit impliquée dans la transition de faible à forte affinité des intégrines leucocytaires pour les récepteurs endothéliaux et donc directement responsable de la forte adhésion du lymphocyte aux cellules endothéliales. Ainsi, les lymphocytes vont pouvoir transmigrer à travers la couche de cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique (Göbel et al., 2014). La voie décrite plus haut, impliquant le PA en tant qu'activateur de la PIP5K1 α qui phosphoryle le PI-4-P en PI-4,5-P₂ semble privilégiée. Ce dernier inhibe l' α -actinine-1, une protéine microfilamentaire, et facilite ainsi son détachement des intégrines et déclenche l'activation de la taline-1. Celle-ci permet une forte affinité des intégrines pour les récepteurs des cellules endothéliales.

1.3.3.8.3.6. La PLD et le cytosquelette

Lors du clonage de la PLD2 en 1997, Colley *et al.* (Colley et al., 1997) postulent que celle-ci, par sa localisation au niveau de la membrane plasmique, est impliquée dans l'endocytose, le trafic vésiculaire et donc dans la réorganisation du cytosquelette.

La PLD est impliquée dans la migration des neutrophiles, dans la phagocytose des macrophages. Tous ces phénomènes impliquent le remodelage du cytosquelette. Il se trouve que la principale fonction atteinte est le contact entre la membrane cible à phagocyter et la membrane du macrophage. Il apparaît chez des cellules sans activité PLD un phénomène de « ruffling » et les membranes ne sont pas aussi parfaitement jointes qu'en situation normale avec activité PLD. D'autres sources permettent de former du PA et donc d'organiser le

cytosquelette d'actine mais son intégrité finale dépend du PA généré par la PLD (Ali et al., 2013). De la même façon la PLD est impliquée dans l'adhésion des leucocytes.

1.3.3.8.3.7. Autres pathologies impliquant la PLD

Dans le cadre d'un syndrome aigu de détresse respiratoire (ARDS pour *acute respiratory distress syndrom*), on note une surexpression de la PLD1 mais pas de la PLD2. Il semble que la PLD1 ait un rôle protecteur de la barrière alvéolaire. La PLD2 de son côté semble avoir l'effet inverse (Abdulnour et al., 2018). L'œdème alvéolaire, caractéristique de l'ARDS, est provoqué par l'internalisation du canal ENaC (*epithelial sodium channel*), canal d'entrée du Na⁺ dans les cellules alvéolaires. Le facteur pathogénique TGF-β, très présent dans la lésion pulmonaire aiguë, se fixe sur son récepteur et induit la phosphorylation de protéines Smad2/3. Ceci permet l'activation de la PLD1 qui produit du PA. Le PA active la PIP5K1α, une kinase qui phosphoryle le PI-4-P en PI-4,5-P₂. Ce phospholipide (qui est aussi un activateur de la PLD1) permet l'activation de la NADPH oxydase 4 dont la production de ROS déclenche l'internalisation du canal ENaC (Peters et al., 2014).

On retrouve la PLD impliquée dans l'infection virale et notamment le virus de la grippe. Le PA formé par la PLD introduit des courbures dans la membrane, facilitant ainsi l'entrée ou la sortie du virus dans et hors de la cellule hôte (Brown et al., 2017).

Le facteur mTOR est aussi activé par le PA ; celui-ci permet la phosphorylation de la protéine CAD (qui contient des domaines carbamoyl-phosphate synthétase, aspartate transcarbamylase et dihydro-orotase) qui induit la biosynthèse de pyrimidine et donc la production de dNTP, l'un des nutriments nécessaires à la division cellulaire ou encore à la duplication d'ADN viral au cours du cycle de réplication. Ainsi son inhibition peut mener à la baisse de production de dNTP. De fait, dans le cadre d'une infection du virus VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine), l'inhibition de la PLD altère les réserves métaboliques (notamment les stocks de dNTP) des cellules T CD4⁺, ce qui entraîne une rupture du cycle viral (Brown et al., 2017).

Une étude montre que les souris PLD1^{-/-} ont un retard de développement cérébral. Ce retard est encore plus important avec les souris PLD2^{-/-} et les doubles mutantes PLD1^{-/-} / PLD2^{-/-}. Dans les trois cas, les souris sont moins sociables, ont moins de mémoire et une sécrétion affaiblie de neurotransmetteurs, comme l'acétylcholine. Ainsi, il apparaît que la PLD1 et la PLD2 sont des protéines primordiales pour le bon développement cérébral, les fonctions cognitives et la neurotransmission cholinergique (Burkhardt et al., 2014).

Enfin, des polymorphismes du gène codant la PLD5 sont retrouvés dans des désordres neuropsychiatriques comme l'autisme où l'on rapporte un polymorphisme du gène codant la PLD5. Il semble toutefois que l'autisme soit caractérisé par plusieurs mutations sur différents gènes (Nelson and Frohman, 2015).

De manière générale, la PLD représente une cible thérapeutique intéressante car elle ne participe jamais de façon essentielle à un processus métabolique. Ainsi, son inhibition peut être mieux tolérée par l'organisme que les chimiothérapies habituelles car elle ne supprime qu'une partie de la voie métabolique (Bruntz et al., 2014b).

Comme toutes les enzymes, la PLD a deux façons de se trouver impliquée dans une pathologie. Elle peut médier une réaction protéine-protéine ou lipide-protéine en permettant le recrutement d'un partenaire, ou elle peut agir de façon indirecte avec la transformation du substrat en produit, c'est alors la disparition du substrat ou l'apparition du produit qui est engagée dans la pathologie. Pour la PLD, il semble que la deuxième possibilité soit à privilégier. En effet la modification des membranes biologiques occupe une part importante dans les phénomènes d'interactions cellulaires, d'entrée ou de sorties de molécules, de transductions du signal. La présence de récepteurs abondants, comme les GPCR (*G protein coupled receptor*) ou les récepteurs TK (tyrosine kinase) dont l'activation va déclencher des voies métaboliques de première importance, rend ce compartiment cellulaire particulièrement sensible aux modifications. Le PA a la particularité d'être un phospholipide avec une tête polaire réduite et donc avec un encombrement stérique moindre que pour les autres phospholipides. Il induit une courbure des membranes plasmiques. Par ailleurs c'est un phospholipide chargé négativement à pH physiologique. Il est donc, et de fait, impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. Cependant, si la PLD est la seule enzyme capable de former du PA directement à partir des phospholipides, d'autres voies de synthèse existent. L'action de la PLC forme le DG et libère la phosphocholine, la phosphorylation du DG par une DG kinase permet de former du PA. Au cours de la glycolyse, le glucose est transformé en dihydroxyacétone phosphate qui est pris en charge par la glycérol-3-phosphate (G3P) déshydrogénase pour former le G3P. L'action d'une glycérol phosphate acyltransférase permet de transférer un premier groupement acyle sur le G3P. Il y a alors formation d'un lysophospholipide et l'action d'une lysophospholipide acyltransférase permet de transférer un second groupement acyle pour former du PA. D'autres voies existent encore, notamment à partir du monoacylglycérol ou du PI.

Ainsi toutes les activités PLD décrites plus hauts ne sont en réalité dues qu'à l'action du PA. On note toutefois que la PLD interagit *via* sa structure ou celle de ces domaines régulateurs avec d'autres protéines, celles-ci participant alors à son activation dont la finalité est la production du PA. C'est cette activité très riche et variée chez l'Homme qui fait que cette enzyme est aujourd'hui considérée comme une véritable cible thérapeutique et son inhibition spécifique pourrait à terme amener vers le traitement de maladies de premier ordre comme des cancers ou des maladies neurodégénératives.

1.3.3.8.4. Chez les bactéries

Le rôle de la PLD chez les bactéries est plus complexe. Si les PLD de mammifères permettent l'endocytose de bactéries, il semblerait que chez les bactéries les PLD aient un rôle similaire associé à la virulence. Par exemple, une PLD sécrétée chez *Neisseria gonorrhoeae* (Ng) recrute les récepteurs du complément CR3 à la surface cellulaire nécessaires à l'endocytose et à la réorganisation du cytosquelette. L'infection facilitée de NgPLD requiert cependant l'interaction avec la tyrosine kinase AKT de la cellule hôte (Edwards et al., 2003).

De même, la toxine Ymt de *Yersinia pestis* s'apparente à une PLD. Cette toxine chez les souris est impliquée dans la transmission du pathogène à la puce (Hinnebusch, 2002).

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste qui touche les sujets immunodéprimés. Contrairement à d'autres bactéries la PLD de *P. aeruginosa* est d'une taille aussi importante que les PLD de mammifères (122 kDa) et partage des caractéristiques communes ; son existence est probablement due à un transfert horizontal. Cette PLD sécrétée est un facteur de virulence qui induit des changements dans le trafic vésiculaire des cellules hôtes. Sa particularité est que son activité catalytique est stimulée par le PI, ce qui explique sa localisation au niveau des vésicules intracellulaires (Spencer and Brown, 2015).

Enfin, certains parasites comme *Plasmodium falciparum* (responsable de la malaria), ou encore *Toxoplasma gondii* (responsable de la toxoplasmose) utilisent les voies métaboliques de la PLD de l'hôte pour leur virulence. De fait, des expériences montrent que le blocage spécifique de cette enzyme réduit la prolifération de ce parasite (Saidani et al., 2014).

1.3.3.8.5. Chez les virus

Des protéines homologues aux PLD existent chez les virus et possèdent les domaines HKD dupliqués. *Vaccinia* est un virus de famille des orthopoxviridae dont le mécanisme de

multiplication est unique parmi les virus à ADN. La réplication s'effectue par une machinerie propre au virus et non par celle de la cellule hôte. Après multiplication du génome viral, le virus s'enveloppe dans une vésicule issue du Golgi. Ainsi le virus est enveloppé d'une double bicouche lipidique. Lors de son excrétion par la cellule, une bicouche reste dans la membrane plasmique de la cellule hôte et la seconde enveloppe le virus. La PLD p37 est modifiée par un mécanisme post-traductionnel qui permet de transférer deux groupements palmitoyls sur deux résidus cystéines. Ainsi, p37 s'associe avec la face cytosolique du *trans-Golgi Network* ou TGN. La PLD p37 participe à l'enveloppement du virus dans le TGN. En réalité, malgré la présence des motifs HKD (qui sont en réalité NKD), cette protéine ne génère pas de PA ni n'effectue de transphosphatidylation. Elle possède cependant toutes les caractéristiques fonctionnelles d'une lipase (activité PLA, PLC et TG lipase). Une autre protéine classée dans la superfamille des PLD par ses caractéristiques de structure primaire est une nucléase. La protéine K4 est peu étudiée et sa fonction peu comprise. De même, des études tendent à montrer qu'elle n'est pas indispensable (Selvy et al., 2011).

1.3.3.9. Inhibiteurs des PLD

Le phénomène d'inhibition est un processus au cours duquel l'activité enzymatique d'une enzyme particulière est ralentie ou bloquée par l'action d'une molécule. L'inhibition spécifique de l'action d'une enzyme dans un contexte métabolique particulier possède, à terme, une évidente visée thérapeutique. C'est en tout cas une recherche qui s'attache à poser les jalons d'une future thérapie. Nous souhaitons toutefois souligner ici que la recherche d'un inhibiteur spécifique d'une enzyme est aussi et surtout un moyen efficace pour comprendre le fonctionnement de celle-ci. La modulation de l'activité catalytique d'une enzyme, son contrôle par l'inhibition ou l'activation, est un moyen de comprendre le mécanisme catalytique mais aussi régulateur de l'enzyme.

Le but d'un inhibiteur est donc de diminuer ou de bloquer l'action d'une enzyme particulière ; ainsi un inhibiteur est d'abord efficace et puissant parce qu'il est spécifique d'une activité et d'une enzyme.

Toute la difficulté réside alors dans le fait de trouver une molécule spécifique qui va empêcher l'activité de se développer avec une enzyme particulière sans pour autant porter atteinte au fonctionnement métabolique de la cellule en interagissant avec d'autres protéines.

Les PLD sont de véritables cibles thérapeutiques. Le détail des rôles de l'enzyme chez l'Homme indique clairement qu'elle est impliquée, *via* la formation de PA, dans des voies de signalisation de la maladie d'Alzheimer, des cancers ou encore de la sclérose en plaques pour ne citer que les pathologies majeures (cf. 1.3.3.8. Rôles physiologiques de la PLD). De la même façon la formation de PA perturbe la structure des membranes biologiques et favorise, par exemple, l'internalisation et la sécrétion de virus (Brown et al., 2017).

Une étude montre qu'une tumeur implantée chez une souris PLD1^{-/-} se développe moins en termes de masse et de taille et est moins vascularisée que chez une souris de type sauvage (Chen et al., 2012). En inhibant l'activité PLD1, les auteurs montrent que la taille de la tumeur, sa masse et sa capacité métastatique sont plus faibles. Ceci constitue donc une véritable preuve que l'inhibition spécifique de l'activité PLD peut être un premier pas vers une thérapie anticancéreuse.

Par la suite, il a été montré que la surexpression de la PLD2 dans des cellules tumorales à faible potentiel invasif les transforme en cellules particulièrement agressives. À l'inverse, la réduction de son expression avec des ARNi permet de réduire la taille de la tumeur de 65 %. Enfin, l'inhibition de la PLD2 par injection d'un inhibiteur spécifique à proximité de la tumeur permet la réduction de la taille de celle-ci de 70 % et la diminution des métastases (Henkels et al., 2013).

Pour les plantes, rapidement après la découverte de la PLD, la modulation de son activité est apparue comme nécessaire preuve de concept. En 1956, le fluorure de sodium (NaF) est utilisé pour bloquer l'activité PLD de coton avec une IC₅₀ de 10 mM sur une enzyme partiellement purifiée (Tookey and Balls, 1956b).

En 1967, Yang *et al.* (Yang et al., 1967), alors qu'ils découvrent chez la PLD végétale la réaction de transphosphatidylatation, décrivent le *p*-chloromercuribenzoate comme un puissant inhibiteur des PLD avec une IC₅₀ de 10 μM. À l'inverse, ils montrent l'innocuité de molécules fixant les groupement thiol comme le iodoacétamide, l'acide iodoacétique ou le N-éthylmaleimide. Ils testent aussi, sans succès, le diisopropyl fluorophosphate qui est un inhibiteur connu des estérases et protéinases à sérine, confirmant alors déjà à l'époque qu'il existe un mécanisme différent pour les PLD (Yang et al., 1967).

La cyclosporine A, de son côté, a été montré comme inhibiteur de l'activité de transphosphatidylatation de la PLD de chou (Madesh and Balasubramanian, 1998). Cette mesure

est effectuée sur une enzyme partiellement purifiée selon un protocole établi en 1958 (Davidson and Long, 1958).

Depuis près de vingt ans, l'unique et discutable processus utilisé pour bloquer la production de PA par la PLD est l'utilisation d'alcool primaire comme le *n*-butanol. Or, l'ajout d'alcool primaire permet d'orienter la réaction catalytique vers la transphosphatidylation et non l'hydrolyse. Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'un mécanisme d'inhibition même si celui-ci empêche la formation de PA qui est l'effecteur principal de l'activité PLD. Cependant l'utilisation d'alcools primaires en tant qu'inhibiteurs de la formation de PA par les PLD, nécessite des concentrations (de l'ordre du molaire) telles qu'elles affectent d'autres voies de signalisations et le fonctionnement normal de la cellule.

On rapporte, dans la littérature, beaucoup d'inhibiteurs, de l'activité PLD *in vivo* ; cependant, un nombre conséquent de ces molécules testées n'ont aucun effet sur la PLD *in vitro*. C'est le cas du resvératrol, de l'honokiol ou encore du triptolide et de bien d'autres molécules (Selvy et al., 2011). Si le mécanisme exact d'action de ces molécules n'est pas décrit, d'autres inhibent l'activité PLD en bloquant un cofacteur de l'enzyme ou en agissant en parallèle. C'est le cas de la fodrine qui diminue la synthèse de PI-4,5-P₂, cofacteur indispensable à l'activité enzymatique, ou encore de la synaptojamine qui hydrolyse le PI-4,5-P₂ en PIP réduisant ainsi la quantité du cofacteur (Selvy et al., 2011). La calphostine-c, un inhibiteur de la protéine kinase C inhibe la PLD en bloquant la PKC, un de ses activateurs (Sciorra et al., 2001), tout comme l'inhibiteur de sérine protéases 4-(2-aminoethyl)benzene sulfonyl fluoride (AEBSF) trouvé dans un cocktail d'inhibiteurs P2714 de Sigma (Andrews et al., 2000).

Enfin, les céramides inhibent l'activité PLD en empêchant la translocation des petites protéines G et PKC vers la membrane bloquant ainsi l'activation de la PLD membranaire (Abousalham et al., 1997b).

Par la suite des inhibiteurs directs ont été découverts. Il s'agit d'analogues structuraux du groupement phosphate des phospholipides comme le phosphate, le tungstate ou le vanadate (Brown et al., 2017). La structure cristalline 3D de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF a été obtenue avec un groupement phosphate (1F0I) ou tungstate (1V0R) dans le site actif de l'enzyme (Leiros et al., 2004).

Certains SERMs (pour *selective estrogen receptor modulators*) comme le tamoxifen ou le raloxifen, miment la structure de l'œstradiol et se fixent aux récepteurs œstrogènes pour bloquer

leur activation. Les SERMs sont donc utilisés pour traiter les cancers du sein porteurs de récepteurs œstrogènes. Cependant, le traitement d'une tumeur sans ce type de récepteur par le tamoxifen diminue la croissance tumorale et induit l'apoptose des cellules. Considérant une forte activité PLD dans les cancers il a été postulé que ces molécules pouvaient avoir un effet inhibiteur sur les PLD. C'est ce qui a été démontré pour le raloxifen qui présente un effet inhibiteur de la PLD alors que le tamoxifen aurait plutôt un effet activateur. De son côté le métabolite actif du tamoxifen, le 4-OH tamoxifen, distingue les deux isoformes PLD1 et 2 en inhibant la PLD2 et activant la PLD1 (Eisen and Brown, 2002).

Cependant, la recherche d'un inhibiteur vise l'obtention d'un inhibiteur spécifique avec la seule PLD pour cible.

La recherche d'un inhibiteur a pris un nouveau tournant en 2007 avec la mise au jour de l'halopémide (N-[2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidinyl]-ethyl]-4-fluoro-benzamide) (Figure 16), une molécule identifiée au cours d'un criblage haut débit d'inhibiteurs de la PLD2 (Monovich et al., 2007). Cette molécule est connue au départ pour être un énergisant psychique ayant un effet significatif sur des patients atteints d'autisme, d'hallucinations et de délires (Loonen and Soudijn, 1985). Un travail d'optimisation de la structure de cet inhibiteur a été entrepris afin notamment de rendre ses analogues plus sélectifs vis-à-vis des PLD1 et 2. L'halopémide, comme l'un de ses dérivés le FIPI (5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopémide) (Figure 16), est considéré comme un inhibiteur dual puisqu'agissant à la fois sur la PLD1 et la PLD2 avec une IC_{50} de 220 et 310 nM *in vitro* (Source Cayman Chemical).

D'autres dérivés ont donc été produits et les molécules sont présentées en Figure 16. Le NBOD est spécifique de la PLD1 comme le RBPC. Le NFOT et le NOPT sont spécifiques de la PLD2.

Plusieurs biais demeurent quant à la mise au point de ces inhibiteurs :

- Tout d'abord ils découlent tous de la même molécule, l'halopémide. Or l'halopémide inhibe la PLD de *Streptomyces chromofuscus* qui ne fait pas partie des PLD à motifs HKD (Kulkarni et al., 2014). Ainsi cet inhibiteur n'inhibe probablement pas au niveau du site catalytique. Il y a toutes les raisons de penser que ses dérivés structurellement proches et inhibiteurs ont tous la même propriété. Il a été démontré récemment que le NFOT interagirait avec une haute affinité sur un site allostérique du domaine PH qui fixe le $PI-4,5-P_2$ et avec une faible affinité sur le site catalytique (Ganesan et al., 2015).

- Ensuite, l'activité mesurée s'effectue avec la PLD humaine qui n'est pas purifiée en quantité importante mais enrichie ou testée *in vivo*. Celle-ci est, de fait, compliquée à activer du fait du grand nombre de molécules activatrices possibles. L'activité mesurée est très faible et nécessite des méthodes ou bien coûteuses comme le kit *Amplex red* ou bien fastidieuses comme l'utilisation d'un substrat radiomarqué.

Enfin, l'effet inhibiteur des NAE est connu sur les PLD végétales où les NAE avec des chaînes de 12, 14, 16 et 18 carbones ont une IC_{50} respectivement de 0,15 μ M (C12:0 et C14:0), 5 μ M et 10 μ M (Austin-Brown and Chapman, 2002). Les auteurs de l'étude testent les NAE sur des PLD recombinantes de ricin et d'*A. thaliana* et sur les PLD commerciales de *Streptomyces chromofuscus* et de chou. Pour le ricin et *A. thaliana* les enzymes sont exprimées dans *E. coli* et testées sur un lysat cellulaire. Ils n'observent pas d'inhibition chez la PLD de *S. chromofuscus* qui, pour rappel, ne possède pas de motifs HKD. Enfin, ils observent un effet des NAE sur la PLD de chou commerciale, cependant le niveau de pureté de cette enzyme est faible (75 % d'impuretés).

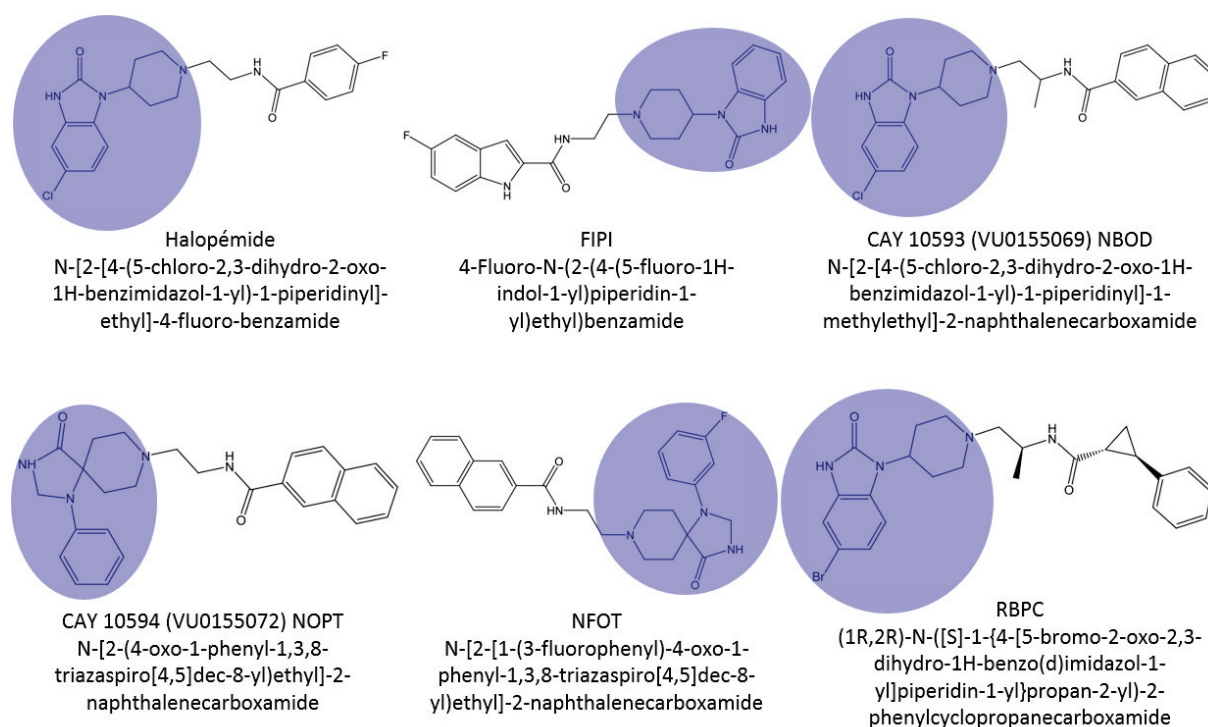


Figure 16 : Halopémidate et les principaux dérivés, inhibiteurs des PLD1 et/ou 2 humaines.

La zone en bleu indique la structure de base dans l'halopémidate autour de laquelle les inhibiteurs ont été construits.

1.3.3.10. Modulation de l'activité PLD par mutagenèse dirigée

La technique de mutagenèse dirigée est régulièrement employée pour modifier la séquence peptidique d'une enzyme de façon spécifique et ainsi vérifier l'effet de cette modification sur :

- L'activité catalytique de l'enzyme ;
- Sa localisation ;
- Sa fixation à des partenaires (protéines, cofacteurs (activateurs et inhibiteurs), substrat) ;
- Sa structure.

La mutagenèse dirigée est une technique mise au point en 1978 par Mikael Smith afin de modifier spécifiquement un ou plusieurs nucléotides à l'aide d'oligonucléotides synthétiques dans l'ADN. Ceci permet donc l'expression d'une protéine mutée, cette modification s'effectue par PCR avec des amorces contenant la mutation. En amplifiant la séquence à partir de ces amorces on peut multiplier le gène cible muté spécifiquement (Mikael Smith a partagé le prix Nobel 1993 pour l'invention de la PCR).

Avec la méthode de mutagenèse dirigée que nous utilisons, nous proposons le remplacement des chaînes latérales des acides aminés de la PLD par un résidu alanyl, systématiquement et ponctuellement. Cette procédure de criblage appelée aussi "*alanine screening*" permet de tester l'importance des chaînes latérales car l'alanyl est un résidu qui n'introduit pas de flexibilité dans la chaîne portée par le carbone alpha comme le ferait la glycine. Par ailleurs c'est un petit résidu neutre, ce qui peut nous permettre de tester à la fois l'effet de perte de charge ou de modification de l'encombrement stérique (Morrison and Weiss, 2001).

Les études qui utilisent la mutagenèse dirigée sur les PLD utilisent bien souvent cette technique pour étudier l'interaction entre la PLD et une protéine comme l'actine et la PLD de tabac (Pleskot et al., 2010), ou encore la PLD avec une protéine G (Zhao and Wang, 2004). La même équipe a ensuite muté des résidus lysyls des motifs PBR (pour *PI-4,5-P₂ binding region*) sur la PLD β d'*A. thaliana*. Ils effectuent ainsi une délétion de toute la région entourant le motif « PREPWHDIH », un motif dont nous montrerons la remarquable conservation au sein des PLD et que les auteurs intitulent PBR1. La délétion de cette région abolit l'activité enzymatique de la PLD β (Zheng et al., 2002).

Plus récemment, trente-neuf mutants différents et six protéines délétées sur différentes zones de la PLD recombinante de chou exprimée et purifiée dans *E. coli* ont été testés (Lerchner et al., 2006). Cela constitue la plus large mutagenèse dirigée sur les PLD de plantes et a permis de comparer ainsi la capacité d'hydrolyse et de transphosphatidylation entre les mutants. Cependant, si les auteurs affirment purifier chaque mutant à homogénéité et vérifier leur expression par immunoempreinte, aucune donnée n'est fournie en ce sens.

Historiquement, la première cible fut la PLD humaine en 1997 lorsque Sung *et al.* (Sung, 1997) décrivent quatre motifs communs aux PLD de mammifères, végétales, microbiennes, bactériennes et virales (voir plus haut). Ils mutent les résidus catalytiques HKD des deux motifs ponctuellement et montrent l'abolition de l'activité PLD pour chacun d'entre eux, ce qui leur permet de conclure que les deux motifs ne fonctionnent pas indépendamment l'un de l'autre. Ils mutent aussi des résidus directement en aval des motifs HKD et des résidus en amont dans le motif CR1b (*conserved region 1b*). Dans cette même étude les auteurs mutent SPO14 (la PLD de levure) et VP37, un homologue des PLD chez le virus *Vaccinia* qui possède un motif NKD au lieu d'HKD. La mutation de ce motif en HKD ne permet pas une activité PLD et à l'inverse la mutation dans la PLD humaine du motif HKD en NKD entraîne une perte d'activité (Sung, 1997).

D'autres études portent sur la PLD bactérienne comme la PLD de *Yersinia pestis* (Rudolph 1999) dont les deux motifs HKD sont mutés ponctuellement. En 2007, dans une étude sur la PLD de *Streptovorticilium cinnamoneum*, les auteurs remplacent ponctuellement les deux motifs HKD par des alanyls. Aucun mutant ne présente alors d'activité (Ogino et al., 2007). Les auteurs mutent aussi le GG en aval du premier motif et le GS en aval du second. Ils testent l'effet de leurs mutations sur la réaction de transphosphatidylation et observent que celles-ci augmentent l'activité enzymatique. Sur la PLD de *Streptomyces septatus*, la mutation des résidus des deux motifs HKD par un alanyl entraîne l'abolition de l'activité catalytique (Uesugi et al., 2005). Sur la PLD de *Streptomyces antibioticus*, la délétion d'une boucle flexible à la surface de l'enzyme permet aux auteurs d'observer différents niveaux d'activités enzymatiques d'hydrolyse et de transphosphatidylation en fonction de la température (Damnjanović et al., 2014).

Plus récemment, une équipe a muté des résidus localisés dans les domaines PX et PH de la PLD humaine. Ils mutent aussi quelques résidus entre les deux motifs HKD afin de construire un modèle d'inhibition de l'enzyme (Ganesan et al., 2015). Sur la même enzyme, d'autres auteurs mutent des sites potentiels de clivage par des caspases ainsi que les résidus du premier motif HKD, le H catalytique et les résidus entre le K et le D catalytique (Jang and Min, 2012). Ils montrent ainsi que les résidus hydrophobes sont impliqués dans l'association des différents domaines de la PLD et sont importants pour la localisation vésiculaire.

L'activité PLD a aussi été modulée par délétion de certaines zones de la séquence. Ainsi, lors du clonage de la PLD de ricin, les auteurs expriment l'enzyme en bactérie sans le propeptide

mais avec une protéine de fusion à la place. L'enzyme ne possède alors aucune activité catalytique que ce soit avec ou sans la protéine de fusion démontrant ainsi l'importance du propeptide (Wang et al., 1994).

Plus tard, des délétions successives de portions N-terminales de la PLD humaines ont été effectuées. En retirant successivement, 100, 157, 228 et 325 résidus, les auteurs montrent que la portion N-terminale de la PLD1 humaine n'est pas requise pour l'activité PLD basale mais sa présence permet des niveaux d'activité supérieur par fixation des partenaires comme ARF1, PKC, Rac1 ou encore RhoA sur les motifs PX et PH. A l'inverse la portion C-terminale dont ils retirent 98 résidus semble requise de même que la boucle régulatrice (Sung et al., 1999a). Ils effectuent la même expérience en retirant 308 résidus en N-terminal de la PLD2 et montrent de la même façon que les domaines PX et PH de la PLD humaine ne sont pas requis pour l'activité PLD (Sung et al., 1999b).

On note à travers toutes ces études de mutagenèse dirigée et de délétion de portions de séquences sur la PLD que les auteurs se sont, la plupart du temps, concentrés sur la caractérisation des motifs HKD constituant le site catalytique ou sur les domaines régulateurs. Un nombre limité d'études s'attachent à caractériser les domaines responsables d'interaction avec le substrat ou des protéines partenaires et sont focalisées sur la PLD humaine.

L'étude proposée dans ce travail de recherche s'attache à caractériser les résidus et les motifs les plus conservés parmi les PLD végétales et mammifères tout le long de la séquence de l'enzyme. Elle s'attache aussi à caractériser avec précision le domaine minimum de la PLD végétale.

1.4. Le métabolisme lipidique chez les algues

Les algues sont un groupe polyphylétique très diversifié d'organismes eucaryotes photosynthétiques. Dans des conditions optimales de croissance, les algues synthétisent des acides gras principalement pour l'estérification de lipides à base de glycérol qui constituent une part importante de leur masse sèche (Hu et al., 2008). Les lipides membranaires majoritaires sont des glycolipides de type glycosylglycérides comme le MGDG, le DGDG ou le SQDG (sulfoquinovosyldiacylglycérol) qui sont particulièrement enrichis dans les chloroplastes. Des phospholipides existent aussi en quantité importante avec comme principaux représentants la PE et le PG présents dans les membranes plasmiques et endoplasmiques.

Dans des conditions de stress ou dans un environnement défavorable à leur croissance, les algues ont tendance à orienter leur métabolisme lipidique vers le stockage de lipides neutres principalement sous forme de TG. Les TG produits par les algues constituent d'importantes réserves de carbone et d'énergie. Après leur synthèse, les TG s'accumulent et constituent des corps lipidiques condensés dans le cytoplasme des cellules ou bien dans l'espace inter-thylacoïde des chloroplastes pour certaines algues où ils forment alors des corps lipidiques appelés plastoglobuli.

Cette propriété d'accumulation des TG a permis d'envisager les algues comme des « industries cellulaires » capables de produire des huiles et des lipides pour les biodiesels, de fait :

- Les algues peuvent accumuler jusqu'à 20 à 50 % de leur masse sèche en TG. Les algues ne contiennent pas de cellulose ni de lignine comme les plantes terrestres, ce qui simplifie leur métabolisme et dirige la majorité des métabolites produits par la photosynthèse vers la synthèse d'amidon, de glycogène ou de lipides.
- Leur croissance peut atteindre 1 à 3 générations par jour.
- Elles tolèrent des milieux de cultures marginaux comme les déserts arides ou semi-arides où l'agriculture conventionnelle n'est pas viable.
- Elles peuvent servir à la production de molécules particulièrement importantes en industrie (biopolymères, protéines, polysaccharides, pigments, fertilisants).
- La biomasse d'une algue cultivée est 5 à 10 fois plus importante qu'une souche génétiquement modifiée de maïs cultivée sur la même surface. Des calculs théoriques indiquent que la production annuelle d'une culture d'algues d'un hectare est de 200 barils d'huiles (environ 30 000 L), ce qui représente 110 fois plus qu'une culture d'un hectare de soja, principale source de biodiesel actuellement aux Etats-Unis.
- Les algues ont une meilleure efficacité de conversion de l'énergie solaire. Entre autres raisons : le stress hydrique, qui provoque la photoinhibition chez les plantes terrestres, est beaucoup moins important chez les algues.
- Enfin, ces organismes ont une réelle diversité écologique, génotypique et métabolique, qui permet de sélectionner les souches les plus adaptées aux conditions d'études (Dismukes et al., 2008; Hu et al., 2008).

La fabrication de biodiesels à partir de TG s'effectue grâce à une réaction de transestérification en utilisant le méthanol ou l'éthanol et permet, en une étape, d'obtenir les esters d'acides gras séparés du glycérol.

Historiquement les algues ont longtemps été une source de protéine et de nourriture. L'utilisation des algues comme source d'énergie remonte au milieu du 20^{ème} siècle avec la production de méthane à partir des carbohydrates qu'elles produisent. C'est à la suite des deux chocs pétroliers des années 1970, qui ont mis en lumière la dépendance des pays développés vis-à-vis du pétrole, que la nécessité de développer une source alternative d'énergie a fait surface. Il est apparu que les algues étaient alors une source inestimable de lipides neutres pour la production de biodiesels.

Cependant, le rendement de production des lipides par les algues n'a jamais atteint le seuil théorique maximal espéré et la fabrication s'est rapidement avérée être très coûteuse. Les récentes fluctuations des prix du pétrole, la diminution des réserves mondiales et l'impact de l'usage des énergies fossiles sur l'environnement ont généré un nouvel intérêt pour l'utilisation des algues comme matière première pour la fabrication de biodiesel. Cependant, avant de pouvoir produire et commercialiser une quantité de biodiesel répondant à la demande mondiale, une nécessaire recherche portant sur la compréhension des mécanismes de fabrication des TG - que ce soit au niveau génétique, cellulaire ou biochimique - doit être menée.

Dans un métabolisme aussi productif en TG que celui des algues, la PLD peut jouer un rôle central avec la synthèse de PA qui est un des principaux précurseurs de TG. En effet, une PA phosphatase déphosphoryle le PA en DG, et une DG acylCoA-acyltransférase transfère un groupement acyle en *sn*-3 pour ainsi former du TG (Ge et al., 2014).

1.4.1. La PLD et la PC chez les algues

Dans la littérature, seules trois publications relatent du rôle de la PLD dans le métabolisme des algues, à savoir :

- La synthèse du PA et son rôle dans les voies de signalisation en particulier pour le maintien de la polarité cellulaire (Mikami et al., 2009).
- L'organisation microtubulaire pendant le développement (Peters et al., 2014) ou encore dans le remodelage des lipides en période de refroidissement (Yang and Li, 2016).

Une quatrième publication analyse la répartition des PLD et de leurs homologues parmi les algues (Beligni et al., 2015). A partir de 27 algues différentes et 53 espèces eucaryotes proches, les auteurs de cette étude bio-informatique ont pu déterminer que tous les types de PLD de la superfamille sont présents chez les algues répondant ainsi à la diversité génotypique dont nous parlions ci-dessus. Il s'agit des PLD à domaine C2 (C2-PLD) mais aussi avec les domaines PX-

PH (PXPB-PLD ou PXPB-like PLD), les mito-PLD, les PPKs (polyphosphate kinase), les CS (Cardiolipine Synthase) et PLD de type bactérien. Ils notent que les algues contiennent plusieurs isoformes de PLD (un maximum de 10 pour *Emiliana huxleyi*) mais moins que les végétaux terrestres comme *Arabidopsis thaliana* (12 PLD), *Oryza sativa* (16 PLD), *Solanum lycopersicum* (18 PLD) ou encore *Glycine max* (23 PLD).

Pour autant, à ce jour, aucune étude ne rapporte le clonage et la caractérisation biochimique d'une PLD d'algue.

Peu d'essais de détection *in vitro* de l'activité PLD ont eu lieu sur les algues. En 2016, Yang *et al.* ont étudié la PLD de *Chlamydomonas reinhardtii*, une autre algue verte. Il s'agit d'un homologue de la mitoPLD humaine. La mitoPLD est une enzyme avec un seul motif HKD qui dimérise en solution pour catalyser sa réaction. La dimérisation permet ainsi de reformer le site catalytique avec deux motifs HKD. Au départ, il s'agit d'une activité PLD localisée au niveau de la mitochondrie. Il semblerait qu'elle hydrolyse préférentiellement le PE et la cardiolipine pour générer du PA. Cependant, son appartenance à la superfamille des PLD est remise en question car elle n'est pas capable de catalyser la réaction de transphosphatidylolation (Madesh *et al.*, 1997). Au cours d'un test *in vitro* où les auteurs extraient les protéines d'un lysat cellulaire de *C. reinhardtii*, ils ne détectent aucune activité PLD de transphosphatidylolation ou d'hydrolyse de la PC (Yang and Li, 2016).

Parmi les phospholipides présents dans les algues, on trouve la PC, substrat préférentielle de la PLD. Cependant, certaines algues comme *C. reinhardtii* n'en synthétisent pas. La voie de synthèse à partir de la choline ou de la PE est manquante (Sato *et al.*, 2016). Toutefois, il a été montré récemment que de la PC est présente parmi les phospholipides de *C. subellipsoidea* (Allen *et al.*, 2017). De fait, une voie de synthèse existe et est décrite en Figure 17.

Dans cette algue, on trouve une choline-phosphate cytidylyltransferase (CCT) qui convertit la phospho-choline en CDP-choline avant transfert vers un DG par une choline phosphotransférase (CPT). Le gène codant cette dernière protéine est manquant, mais chez les végétaux, il est possible que cette fonction soit assurée par une éthanolamine phosphotransférase (EPT) dont le gène existe chez *C. subellipsoidea* (Figure 17). On trouve le gène phosphoéthanolamine N-méthyltransferase (PEAMT) dont la fonction est de coder une protéine qui va méthyler à trois reprises la phosphoéthanolamine pour générer une phosphocholine. De fait, il n'y a pas de gène codant la choline kinase (CKI) ce qui suppose que

l'algue ne peut pas métaboliser la choline. Logiquement, on ne trouve pas de PC synthase (PCS) dont le rôle est de transférer un groupement polaire choline sur un CDP-DG. De plus, il n'y a pas non plus de gènes pour coder la protéine PEMT (phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase) susceptible de réaliser la première méthylation de la PE. Il semble que le gène codant une phospholipide N-méthyltransférase (PMET) responsable des deux dernières méthylations existe dans cette algue. Cependant, la protéine produite est beaucoup plus courte que la PMET d'autres algues. Il est donc difficile de définir si cette protéine est fonctionnelle dans cette voie qui, de toute façon demeure incomplète sans PEMT. Certaines algues vertes utilisent trois PMET pour méthyler la PE et générer la PC. Il est tout à fait possible que *C. subellipsoidea* fasse partie de ce type d'algues. En tout cas, ce type de biosynthèse avec deux PMET et sans PEMT existe chez les plantes terrestres indiquant que la synthèse de PC est tout à fait possible dans ces conditions métaboliques (Hirashima et al., 2018). Il est donc assuré dans *C. subellipsoidea*, qu'au moins une voie de synthèse existe pour la PC (Figure 17).

La PC étant donc présente dans *C. subellipsoidea* (Allen et al., 2017), nous pourrions tester l'activité PLD sur la PC comme nous le faisons avec les autres PLD recombinantes.

L'objet de ces travaux de thèse est la PLD α , cette isoforme majoritaire possède un domaine C2 dans la partie N-terminale de l'enzyme. Les C2-PLD chez les algues sont retrouvées dans cinq espèces différentes : deux PLD existent chez *Chondrus crispus* et *Porphyridium purpurum* (algues rouges), une seule PLD existe chez les diatomées *Thalassiosira pseudonana* et *Phaedactylum tricorutum* tout comme chez *Coccomyxa subellipsoidea* (algue verte). Cependant, une des PLD de *C. crispus* possède un motif HKD N-terminal HXKX₄T et celle de *C. subellipsoidea* possède un motif HXKX₄S là où la littérature et nos expériences s'accordent à dire et démontrer que le motif catalytique est de la forme invariable HXKX₄D (Beligni et al., 2015).

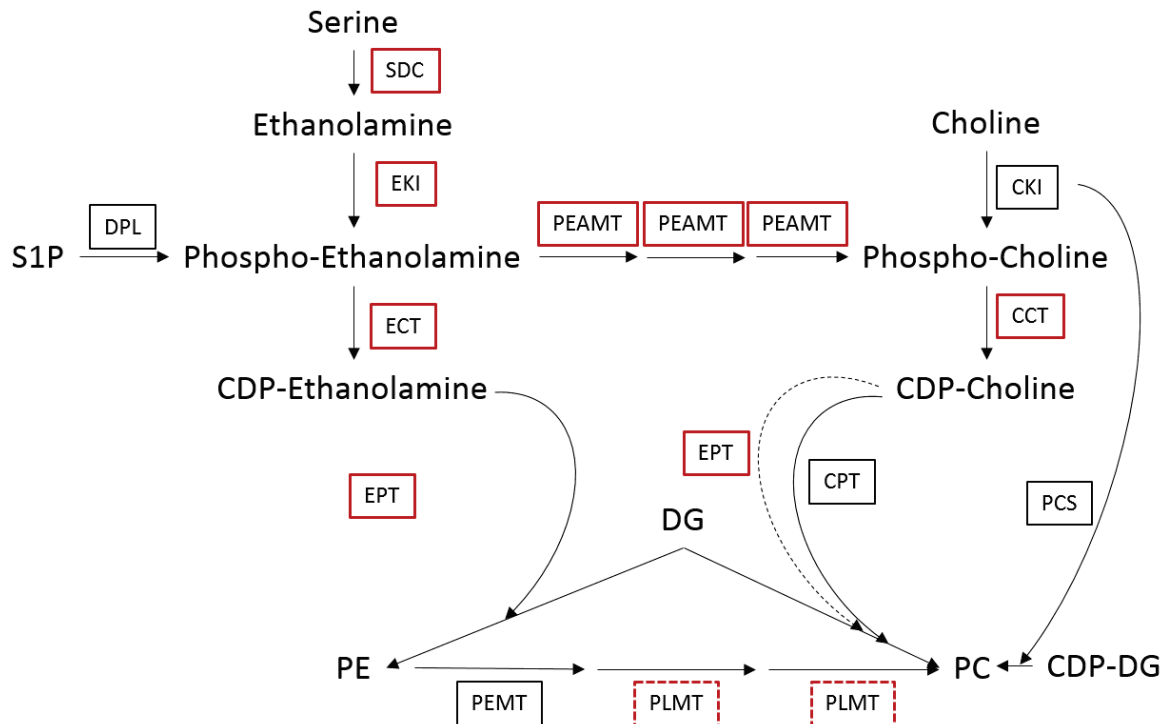


Figure 17 : Voies générales de synthèse de la PC.

Les enzymes sont encadrées. Les enzymes encadrées en rouge sont celles présentes dans le génome de *C. subellipsoidea*, celles encadrées en rouge pointillé indiquent les enzymes présentes mais dont la capacité fonctionnelle est en doute. SDC : serine décarboxylase. EKI : éthanolamine kinase. DPL : sphingosine-1-phosphate lyase. ECT : phospho-éthanolamine-phosphate cytidylyltransferase. EPT : éthanolamine phosphotransferase. CKI : choline kinase. CCT : choline-phosphate cytidylyltransferase. CPT : choline phosphotransferase. PEAMT : phosphoéthanolamine N-méthyltransferase. PEMT : phosphatidyléthanolamine N-méthyltransferase. PLMT : phospholipide N-méthyltransferase. PCS : phosphatidylcholine synthase. S1P : sphingosine-1-phosphate. CDP : cytidine diphosphate. D'après (Sato et al., 2016) et (Hirashima et al., 2018).

2. Matériel & méthodes

2.1. Expression recombinante de PLD végétales

2.1.1. Microbiologie

2.1.1.1. Souches bactériennes

2.1.1.1.1. *Escherichia coli* TOP10

Génotype : *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*.

Le génotype *mcrA* confère une absence de méthylation ou de restriction de l'ADN étranger à la souche, par ailleurs cette souche est délétée des gènes *mrr* et *mcrBC*, responsables de la restriction de séquences d'ADN méthylées, et du gène *hsdRMS* qui permet dès lors la transformation efficace de produits de PCR non méthylés. De même, la mutation *endA1* permet l'élimination des digestions non spécifiques pas des endonucléases. La mutation *recA1* sur la recombinaise A1 réduit l'apparition fortuite de recombinaisons. Ces mutations permettent une plus grande compétence des cellules de la souche TOP10 dont l'usage ici consiste à multiplier des ADN plasmidiques. Enfin, le génotype *rpsL(StrR)* indique que la souche est résistante à la streptomycine.

2.1.1.1.2. *Escherichia coli* BL21 CodonPlus (Stratagene)

Génotype : *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS*

Le génotype λDE3 indique que la souche possède le gène de la *T7 RNA polymerase* sous la dépendance du promoteur *lacUV5* inductible à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cette souche permet la surexpression de protéines recombinantes dont le gène correspondant sera cloné en aval du promoteur T7, donc reconnu par la T7 RNA polymerase. Par ailleurs, la souche BL21 CodonPlus contient le plasmide pRIPL (*Novagen*). Ce plasmide permet de coder des codons rares chez *E. coli* (*argU* (*AGA, AGG*), *ileY* (*AUA*), *proL* (*CCC*), *leuW* (*CUA*)) mais fréquents chez les mammifères et les plantes. Il est utilisé notamment pour surexprimer des protéines recombinantes issues d'organismes riches en *GC* tels que la souris. Ce plasmide confère la résistance au chloramphénicol.

2.1.1.1.3. *Escherichia coli* DH5 α TM-T1R kit GENEART (Life Technologies)

Génotype : *F* - *f80lacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*)*U169* *recA1* *endA1* *hsdR17*(*rk-*, *mk+*) *phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* *tonA*.

Cette souche *mcrBC*⁺ est capable de dégrader l'ADN méthylé. Elle est utilisée en mutagenèse dirigée car elle permet de discriminer l'ADN matriciel méthylé (qui sera donc dégradé), de l'ADN néosynthétisé par PCR non méthylé comportant la mutation désirée.

2.1.1.1.4. *Escherichia coli* GM48

Génotype : *F*⁻ *thr* *leu* *thi* *lacY* *galK* *galT* *ara* *fhuA* *tsx* *dam* *dcm* *glnV44*.

Cette souche *dam*⁻ et *dcm*⁻ ne méthyle pas l'adénine d'une séquence *GATC* ni la seconde cytosine d'un site *CC(A/T)GG*. Cette souche permet l'utilisation de l'enzyme de restriction *BclI* reconnaissant le site *T/GATCA* qui est donc sensible à la méthylation de type *dam*.

2.1.1.1.5. *Escherichia coli* JM109

Génotype : *endA1* *glnV44* *thi-1* *relA1* *gyrA96* *recA1* Δ (*lac-proAB*) [*F'* *traD36* *proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ *M15*] *hsdR17*(*rK*⁻*mK*⁺).

Cette souche est partiellement délétée du gène *LacZ* et n'exprime que le peptide ω de la protéine β -galactosidase. En transformant cette souche par le plasmide pGM[®]-T Easy, si celui-ci ne contient pas d'insert dans le site de clonage, il permet la synthèse du peptide α de la β -galactosidase. La présence des deux peptides permet une enzyme fonctionnelle qui clive le X-Gal présent sur le milieu de culture et l'apparition d'une pigmentation bleue des colonies. Ainsi, ce système permet de cribler les événements de ligation au sein du plasmide pGM[®]-T Easy par la couleur des colonies (Figure 19).

2.1.1.1.6. Milieux et conditions de culture

Les cultures de bactéries s'effectuent en milieu LB (*Lysogeny Broth*) composé de 10 g de bactopeptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl (pour 1 L de milieu). Les milieux sont solidifiés par 15 g/L d'agar et stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C. Les antibiotiques sont utilisés à une concentration finale de 0,1 mg/mL dans les milieux de culture. Les cultures de bactéries s'effectuant en présence de zéocine ont lieu dans un milieu LB "low salt" contenant

uniquement 5 g/L de NaCl. Une boîte de Petri contient 25 mL de milieu solide avec présence ou non d'antibiotique. Les souches d'*E. coli* sont cultivées à 37 °C ou 30 °C. Quand nécessaire, de l'IPTG est ajouté en phase stationnaire de croissance à 1 mM final.

2.1.1.1.7. Transformation d'*Escherichia coli*

Les transformations s'effectuent avec des cellules d'*E. coli* rendues électrocompétentes par lavages extensifs à l'eau distillée. Ainsi, une culture (50 mL) sur la nuit est diluée au 1/50^{ème} et cultivée (1 L) jusqu'à atteindre une densité optique comprise entre 0,7 et 1. Les cellules sont conservées 10 min dans la glace puis centrifugées à 4000 x g à 4 °C pendant 10 min et le culot est lavé par 400 mL d'eau glacée. Trois lavages successifs sont ainsi effectués afin d'épurer les cellules des sels contenus dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite reprises dans 20 mL d'eau glacée puis centrifugées. Enfin, les cellules sont resuspendues dans 4,3 mL d'eau glacée et 700 µL de glycérol 80 % (v/v) est ajouté, pour une suspension finale de 5 mL de cellules dans 10 % (v/v) de glycérol. Ceci constitue le stock de cellules compétentes dont des aliquotes de 40 µL sont conservées à -80 °C.

Les transformations de cellules s'effectuent à 2,5 kV pendant 5,9 ms à l'aide d'un MicroPulser (Bio-Rad) et d'une quantité d'ADN plasmidique de 20 ng ou 1 µL de produit de ligation. Les cellules transformées sont reprises dans du milieu LB et placées à 37 °C pendant 30 min puis celles-ci sont ensuite étalées sur boîtes de LB-agar contenant l'antibiotique approprié.

Les clones sélectionnés sur milieu LB contenant l'antibiotique approprié sont remis en culture dans 100 µL de LB liquide avec le même antibiotique pendant 4 h à 37 °C avant de tester la présence du plasmide par PCR.

2.1.1.2. Souches de levure, milieux et conditions

2.1.1.2.1. *Pichia pastoris* X33

Génotype : *Mut+*.

Cette souche *Mut+* possède deux copies des gènes de l'alcool oxydase *AOX1* et *AOX2* permettant une meilleure croissance sur milieu contenant du méthanol. Cette caractéristique permet une meilleure expression des protéines recombinantes.

2.1.1.2.2. *Pichia pastoris* SMD1168

Génotype : *his4 pep4*.

Cette souche de *P. pastoris* est mutée sur le gène codant la protéase A, une aspartyl protéase vacuolaire nécessaire à l'activation de certaines protéases vacuolaires comme la carboxypeptidase Y et la protéinase B.

2.1.1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae* 062

Génotype : *W303 (Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1)*.

Cette souche est déficiente dans la synthèse d'histidine, de leucine, de tryptophane et d'uracile. De même elle est déficiente pour la synthèse d'adénine (*ade2-1*) et de la perméase CAN1 qui permet le transport intracellulaire de l'arginine. L'expression de la protéine d'intérêt dans une telle souche constitue une méthodologie de base dans l'optique de cribler des banques de mutants disponibles chez cet organisme modèle en génétique.

2.1.1.2.4. *Saccharomyces cerevisiae* YKB 2239

Génotype : *MATa/a ade2-10/ade2-101 his3-Δ200/ his3-Δ200 leu2-Δ1/leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ63/trp1-Δ63 ura3-52/ura3-52*.

Cette souche donnée par l'équipe canadienne de Kristin Baetz (Kennedy et al., 2011) est déficiente dans la synthèse d'adénine, d'histidine, de leucine, de lysine, d'uracile et de tryptophane.

2.1.1.2.5. *Saccharomyces cerevisiae* YKB 2079

Génotype : *MATa/a ade2-10/ade2-101 his3-Δ200/his3-Δ200 leu2-Δ1/leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ63/trp1-Δ63 ura3-52/ura3-52 spo14Δ::TRP/spo14Δ::TRP*.

Cette souche est un mutant de la souche précédente YKB 2239 dans laquelle le gène codant la PLD SPO14 est délété et remplacé par un gène *TRP* codant une enzyme de la voie de biosynthèse du tryptophane. Ces deux souches se distinguent donc par leur auxotrophie.

2.1.1.2.6. Milieux et conditions de culture

Les cultures de la levure *P. pastoris* s'effectuent en milieu YPG (*Yeast Peptone Glucose*) composé de 10 g de bactopeptone, 10 g d'extrait de levure et 20 g de glucose (pour 1 litre de

milieu). Pour *Saccharomyces cerevisiae*, les cultures s'effectuent en milieu YNB-glucose (*Yeast Nitrogen Base*) composé de 10 g de YNB et 20 g de glucose (pour 1 L de milieu). Ce milieu est supplémenté avec de l'histidine (50 µg/mL), de la leucine (50 µg/mL), du tryptophane (25 µg/mL), de l'uracile (2,5 µg/mL), de la lysine (50 µg/mL) ou bien de l'adénine (25 µg/mL). L'induction des cellules de *S. cerevisiae* s'effectue dans du YPG galactose (10 g de bactopeptone, 10 g d'extrait de levure et 20 g de galactose pour 1 L de milieu). Les levures sont cultivées à 30 °C.

2.1.1.2.7. Transformation de *Pichia pastoris*

Un clone de *P. pastoris* est mis en culture dans 50 mL de YPG pendant 24 h à 30 °C sous agitation. Les cellules sont ensuite centrifugées à température ambiante à 1500 x g pendant 5 min puis lavées deux fois par 40 mL d'eau stérile à température ambiante, puis deux fois par 20 mL de sorbitol 1 M à température ambiante. Les cellules sont enfin reprises dans un volume équivalent à 1,5 mL pour une DO₆₀₀ de 750 dans le sorbitol 1 M. Ceci constitue le stock de cellules compétentes.

La transformation s'effectue avec un ADN plasmidique linéarisé par l'enzyme de restriction AvrII, et purifié par le kit Qiaquick de Qiagen. Selon la concentration d'ADN, entre 400 ng et 2000 ng sont introduits dans une cuve d'électroporation avec 80 µL de cellules compétentes. La transformation s'effectue à 2 kV pendant 6 ms à l'aide d'un MicroPulser (Bio-Rad) correspondant au programme Pic de l'électroporateur. Les cellules sont reprises dans 1 mL de sorbitol 1 M et incubées au moins 1 h à 30 °C. Les cellules sont centrifugées comme précédemment et 500 µL de surnageant est retiré. Les cellules sont étalées en deux fois 400 µL et 100 µL sur un milieu solide YPG contenant de la zéocine (100 µg/mL). Après incubation de 48 h à 30 °C, les clones sélectionnés sont réétalés sur milieu solide YPG contenant de la zéocine (200 µg/mL).

Enfin, les génomes des clones sélectionnés sont extraits (cf. 2.1.3.4. Extraction des génomes de *Pichia pastoris*) et l'insertion du gène d'intérêt est testé par PCR.

2.1.1.2.8. Transformation de *Saccharomyces cerevisiae*

Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* issues d'une culture de 50 mL sont centrifugées à 1500 x g pendant 2 min à température ambiante. Les cellules sont lavées deux fois par 1 mL d'eau stérile puis une fois par 1 mL d'un tampon composé de 100 mM d'acétate de lithium, de

10 mM de Tris/HCl, pH 7,5, et 1 mM d'EDTA (AcLi-TE). Cette étape de lavage permet de créer des pores dans la membrane et va constituer le stock de cellules compétentes.

Les transformations s'effectuent en présence d'ADN de sperme de saumon (10 μ L à 10 mg/mL dans le tampon TE) dénaturé qui joue le rôle de protecteur de l'ADN à transformer par sa structure simple brin qui va protéger des nucléases et se fixer sur les sites non spécifiques. On ajoute 50 μ L de cellules compétentes et 500 de tampon AcLi-Te à 40 % (p/v) de polyéthylène glycol (PEG). Ceci permet de fragiliser les membranes tout en gardant l'ADN au contact des cellules. Celles-ci sont incubées à 30 °C pendant 30 min puis subissent un choc thermique à 42 °C pendant 15 min. Les cellules sont centrifugées 30 secondes à 1500 x g et le culot est repris dans 100 μ L de YNG-glucose 2 % (p/v). Les cellules sont finalement étalées sur boîtes de YNB-agar supplémentées avec les acides aminés et bases azotées appropriés.

2.1.2. Culture cellulaire

2.1.2.1. Cellules PC-3

Les cellules PC3 sont des cellules tumorales prostatiques humaines qui sont hormono-indépendantes (la croissance est indépendante de la présence d'androgènes). Ces cellules sont issues d'une métastase osseuse de cancer de prostate d'un homme caucasien de 62 ans ayant subi une hormonothérapie (Kaighn et al., 1979). Les cellules PC3 ont un temps de doublement de 30 h environ et sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 complété de Glutamax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) et de 10 % de SVF.

2.1.2.2. Test de toxicité

La toxicité d'un composé pour les cellules est mesurée par la quantité de lactate deshydrogénase (LDH) libérée au cours de la lyse cellulaire. Le surnageant de culture est collecté sans cellule et incubé avec le mélange réactionnel à partir du kit *Cytotoxicity detection* de Roche. Le milieu de culture (50 μ L) est mélangé à 50 μ L d'une solution composée de 1,125 mL de solution A qui contient un catalyseur (mélange diaphorase/NAD⁺), et 50 μ L de solution B qui est un colorant (chlorure d'iodotétrazolium (INT) et lactate de sodium). L'activité de la LDH est déterminée au cours d'un dosage colorimétrique. Le NAD⁺ est réduit en NADH + H⁺ par la conversion, catalysée par la LDH, du lactate en pyruvate qui est spécifiquement détecté à 490 nm, puis le NADH + H⁺ est réoxydé par une diaphorase en présence du sel de tétrazolium (INT) qui est réduit en formazan et qui peut être détecté spécifiquement à 570 nm.

2.1.2.3. Test de viabilité

L'évaluation de la viabilité cellulaire est réalisée par un test de quantification colorimétrique des cellules. Ce test est basé sur l'utilisation d'un sel de couleur jaune, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). Il est réduit, par la succinate déshydrogénase des cellules vivantes et métaboliquement actives, en présence de NADH/NAD⁺, pour donner des cristaux de formazan violets dans les mitochondries. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

Une solution de MTT à une concentration de 5 mg/mL est préparée stérilement dans du PBS ("Phosphate-Buffered Saline", NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM (pH 7,4)) et conservée à -20 °C à l'abri de la lumière. Le MTT est ajouté au milieu de culture en contact avec les cellules à une concentration finale de 0,125 mg/mL et incubé pendant 4 h à 37 °C. Ensuite, le milieu est éliminé et 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) est ajouté pour solubiliser les cristaux de formazan. L'absorbance est mesurée dans un spectrophotomètre à 570 nm. Les résultats sont présentés en % par rapport à un contrôle non traité (100 % viabilité). Ce test est utilisé notamment pour mesurer la viabilité des cellules en présence d'inhibiteurs de la PLD.

2.1.3. Biologie moléculaire

2.1.3.1. ADN matrice

L'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN messager de la PLD α 1 d'*A. thaliana* (*AtPLD α*) (Dyer et al., 1995) a été fourni par le Pr. X. Wang (Université du Missouri, St. Louis). Il est à noter que cet ADNc diffère de quelques résidus par rapport à la séquence modèle (AT3G15730) proposée par la base de données TAIR ("The Arabidopsis Information Resource").

L'ADNc de l'ARN messager de la PLD de *Coccomyxa subellipsoidea* (*CsPLD*) a été cloné au cours de ces travaux de thèse.

2.1.3.2. Plasmides

2.1.3.2.1. pET28b

Le plasmide pEt28b(+) (Novagen) (Figure 20) confère la résistance à la kanamycine. Il s'agit d'un vecteur d'expression inductible à l'IPTG qui contient le gène répresseur *LacI* qui réprime

l'expression constitutive du gène d'intérêt en fixant le produit de *LacI* sur l'opérateur *LacO*. L'ajout d'IPTG, ou induction, permet de lever cette répression en séquestrant LacI déclenchant ainsi l'expression du gène situé en aval du promoteur *T7* (Figure 18). Ce promoteur n'est reconnu que par l'ARN polymérase du bactériophage T7, une enzyme absente des souches sauvages d'*E. coli*. Ainsi, uniquement les souches génétiquement modifiées par l'ajout du gène codant cette polymérase, telles que la souche BL21, sont capables d'exprimer la protéine cible. En aval du promoteur T7 et de l'opérateur *lacO* se situe un site de fixation au ribosome (RBS), 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 ainsi que la possibilité de fusionner une étiquette poly-histidine (6xHis) en position N- ou C-terminale de la protéine d'intérêt. 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 gène *rop* permet le contrôle du nombre de copies du plasmide par cellule. L'origine de réplication *pBR322* est l'origine de réplication bactérienne *pMB1* (15 à 20 copies/cellule) issue du vecteur pBR322.

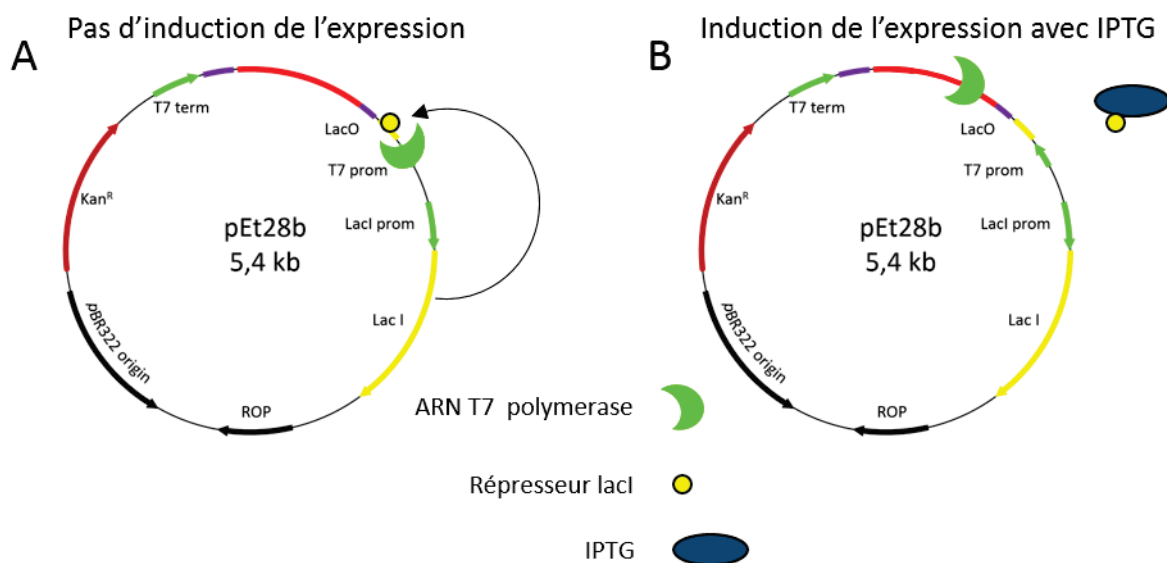


Figure 18 : Schéma du mécanisme de répression et d'induction de l'expression d'un gène cloné dans le plasmide pEt28b.

A) A l'état basal, le gène *lacI* permet de synthétiser le répresseur LacI qui se fixe sur l'opérateur LacO situé entre le promoteur de l'ARN T7 polymérase et le gène d'intérêt, ceci permet le blocage de la polymérase. B) Lors de l'ajout d'IPTG, celui-ci séquestre le répresseur lacI permettant ainsi de lever la répression sur l'opérateur *lacO* et la synthèse du gène d'intérêt par la T7 polymérase.

L'insert *Nt-(His)₆AtPLD α* , qui code *AtPLD α* avec une étiquette 6xHis en amino-terminal, est cloné entre les sites *PciI* (A/CATGT) et *NotI* (GC/GGCCGC). Ce gène est sous la dépendance d'un promoteur reconnu par la T7 RNA polymérase.

L'insert *CsPLD* est cloné entre les sites *NdeI* (CA/TATG) et *NotI* (GC/GGCCGC).

2.1.3.2.2. pGAPZB

Le plasmide pGAPZB (Figure 20) confère la résistance à la zéocine dont le gène est sous la dépendance du promoteur *EM7*, un promoteur dérivé du promoteur *T7* qui permet l'expression constitutive de la cassette de résistance dans *E. coli*. Les gènes d'intérêts sont sous la dépendance du promoteur *pGAP*, promoteur de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, un promoteur constitutif qui permet la surexpression chez la levure *P. pastoris*. Au cours de la transformation le plasmide pGAPZB linéarisé par l'enzyme *AvrII* se recombine spontanément au sein du génome de *P. pastoris*. L'origine de répllication *pUC* permet la propagation, le maintien et la répllication de ce plasmide chez *E. coli*.

L'insert *AtPLD α* , qui code *AtPLD α* , est cloné entre les sites *XhoI* (C/TCGAG) et *NotI* (GC/GGCCGC). L'insert *Nt-(His)₆AtPLD α* , qui code la PLD α d'*A. thaliana* avec une étiquette (His)₆ en amino-terminal, est cloné entre les sites *SacII* (CCGC/GG) et *NotI* (GC/GGCCGC). L'insert *VuPLD*, correspondant au gène codant la PLD α de *V. unguiculata*, est cloné entre les sites *EcoRI* (G/AATTC) et *XhoI* (C/TCGAG). L'insert *CsPLD* qui code la PLD de *C. subellipsoidea* est cloné entre les sites *EcoRI* (G/AATTC) et *NotI* (GC/GGCCGC).

2.1.3.2.3. pYES2

Le plasmide pYES2 (Figure 20) confère la résistance à l'ampicilline (Amp^r) chez *E. coli*. Le gène d'intérêt est sous la dépendance du promoteur *pGAL1*, promoteur de la galactokinase, un promoteur inductible au galactose permettant la surexpression des protéines chez *S. cerevisiae*. Le promoteur *T7* permet la transcription constitutive du plasmide et l'origine de répllication *pUC* permet la propagation, le maintien et la répllication de ce plasmide chez *E. coli*. L'origine de répllication de levure 2 μ permet de maintenir et propager le plasmide dans l'hôte (> 50 copies/cellule). Enfin, le gène *URA3* sous la dépendance de son promoteur permet de coder l'enzyme responsable d'une étape de la biosynthèse de l'uracile manquante dans les souches de *S. cerevisiae* utilisées. L'insert *Nt-(His)₆AtPLD α* , qui code *AtPLD α* avec une étiquette (His)₆ en amino-terminal, est cloné entre les sites *KpnI* (GGTAC/C) et *NotI* (GC/GGCCGC).

2.1.3.2.4. pGM[®]-T Easy

Le plasmide pGM[®]-T Easy (Figure 20) confère la résistance à l'ampicilline. C'est un vecteur de clonage linéarisé au niveau du *MCS*, aux extrémités 3' T sortantes, qui permet de religuer un fragment de PCR de façon non spécifique grâce à ces extrémités 3' A sortantes. L'origine de réplication *pUC* permet la propagation, le maintien et la réplication de ce plasmide chez *E. coli*. Ce plasmide permet de cribler les événements de religation par la couleur des colonies. En effet, l'absence d'insert cloné dans le vecteur permet de former le peptide α de la β -galactosidase. Celui-ci en complément du peptide ω présent dans la souche JM109 d'*E. coli* permet une enzyme fonctionnelle qui clive le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) présent sur le milieu de culture et permet l'apparition d'une pigmentation bleue des colonies. En présence d'un fragment de PCR inséré entre les deux extrémités T sortantes le peptide α ne peut pas se reformer, le X-gal n'est pas clivé et les colonies sont blanches (Figure 19).

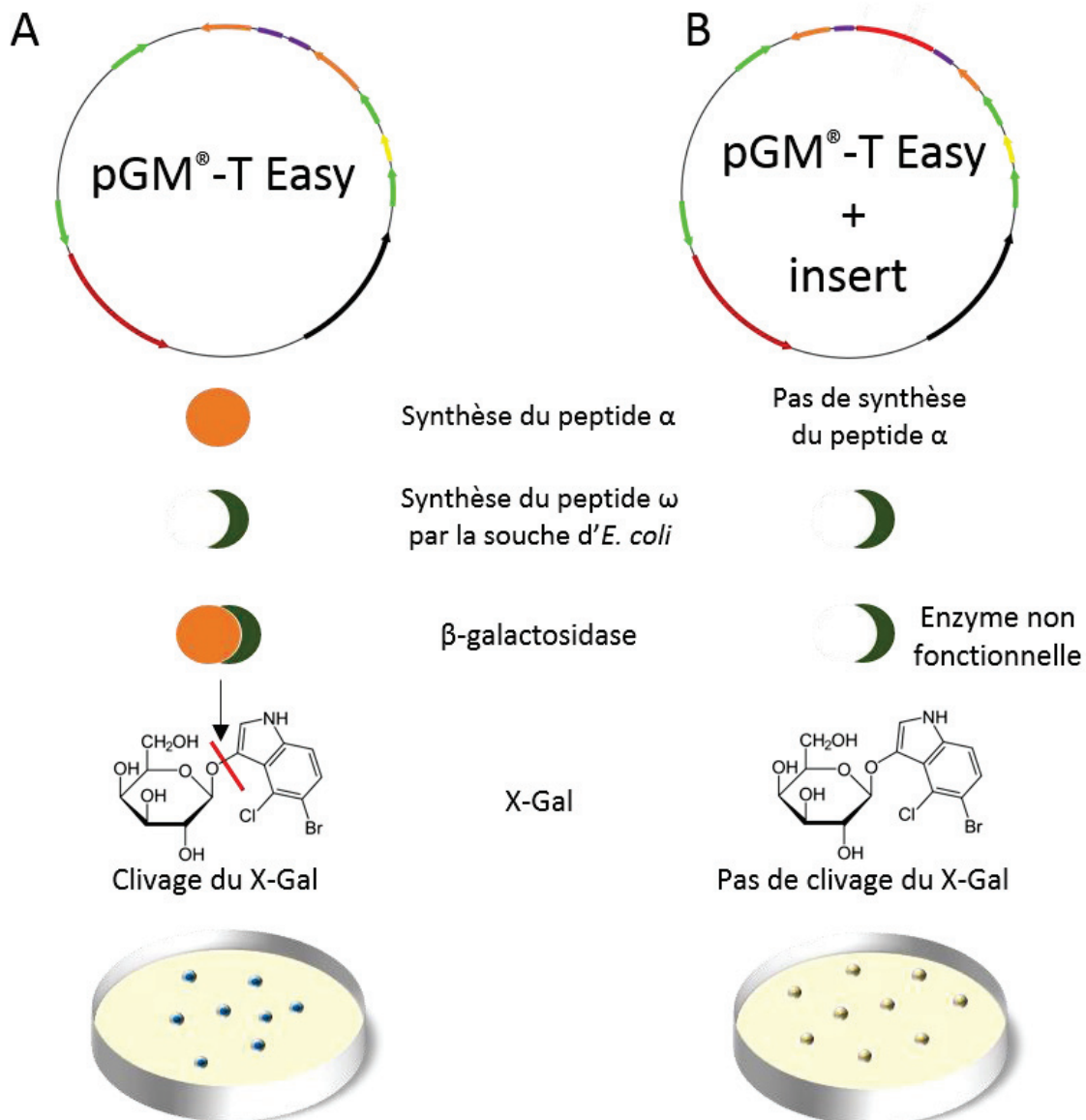


Figure 19 : Principe de la sélection d'un insert cloné dans le vecteur pGM[®]-T Easy.

A) L'insert n'est pas cloné dans le vecteur qui se religie sur lui-même permettant ainsi la synthèse du peptide α de la β -galactosidase. Celui-ci en complément du peptide ω présent dans la souche JM109 d'*E. coli* permet une enzyme fonctionnelle qui clive le X-gal présent sur le milieu de culture et permet l'apparition d'une pigmentation bleue des colonies. B) L'insert est cloné dans le vecteur et la synthèse du peptide α de la β -galactosidase n'est pas possible, le X-Gal ne peut pas être clivé et les colonies sont blanches.

2.1.3.2.5. pRS415

Le plasmide pRS415 (Figure 20) confère la résistance à l'ampicilline (*Amp^R*). Les gènes clonés sont sous la dépendance du promoteur *T7*, l'origine de répllication *pUC* permet la propagation, le maintien et la répllication de ce plasmide chez *E. coli*. Ce vecteur à faible nombre de copies contient une partie de séquence *ARS* (*Autonomously Replicating Sequence*) et une partie de

séquence de centromère (*CEN*) lui permettant de se répliquer comme de petits chromosomes indépendants. Le gène *LEU2* sous la dépendance de son promoteur *Leu2* permet de coder l'enzyme responsable d'une étape de la biosynthèse de la leucine absente dans les souches utilisées.

2.1.3.2.6. pME962

Le plasmide pME962 confère la résistance à l'ampicilline. Le gène *LEU2* permet de coder l'enzyme responsable d'une étape de la biosynthèse de la leucine. L'origine de réplication *pUC* permet la propagation, le maintien et la réplication de ce plasmide chez *E. coli* et l'origine de réplication de levure 2μ permet de maintenir et propager le plasmide dans l'hôte (> 50 copies/cellule). Il est dérivé du plasmide Yep351 (Figure 20) dans lequel le gène *SPO14* du plasmide pME865 a été intégré.

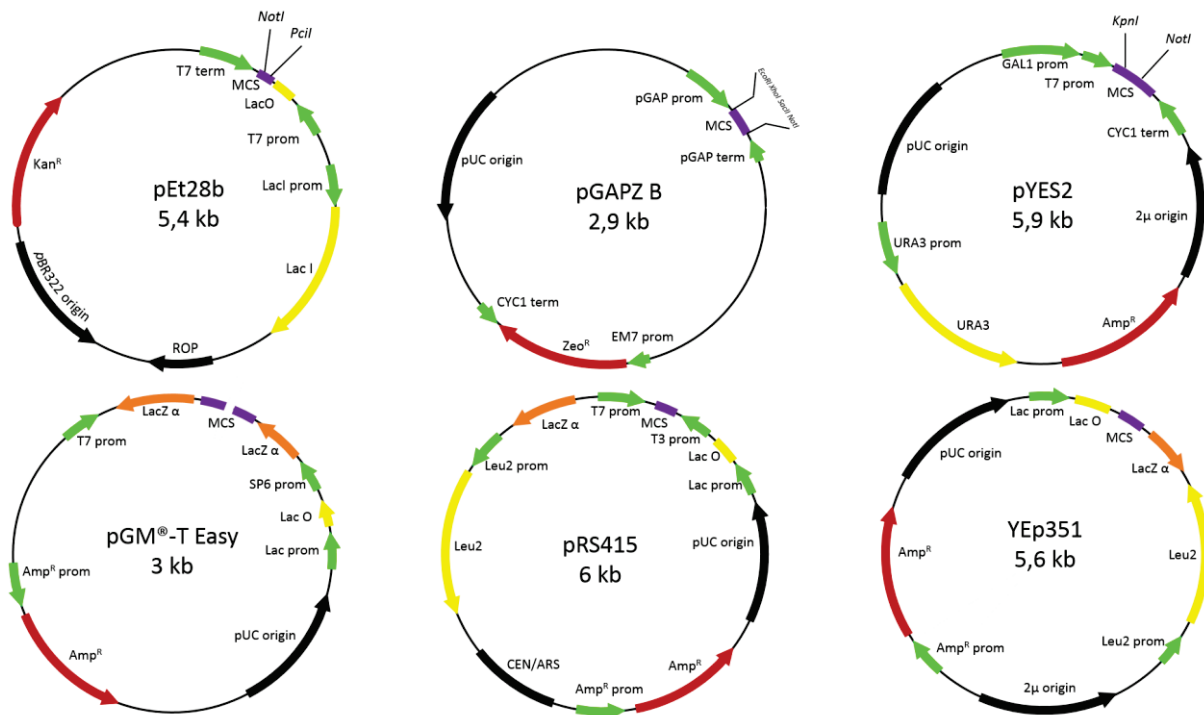


Figure 20 : Représentation schématique des plasmides utilisés.

Les portions en noir indiquent les origines de réplication, en rouge les résistances aux antibiotiques, en vert les promoteurs et terminateurs, en violet le MCS, et en jaune et orange d'autres gènes régulateurs. MCS : Sites de clonage multiples. prom : promoteur. term : terminateur. origin : origine de réplication. *Kan^R* : gène de résistance à la kanamycine. *Zeo^R* : gène de résistance à la zéocine. *Amp^R* : gène de résistance à l'ampicilline. *Lac I* : gène codant le répresseur LacI. *Lac O* : gène codant l'opérateur LacO. *LacZ α* : gène codant le peptide α de la β -galactosidase. *Leu2* : gène codant une enzyme la biosynthèse de la leucine. *URA3* : gène codant une enzyme la biosynthèse de l'uracile.

2.1.3.3. Purification des plasmides par midi préparation

Les midipréparations de plasmides s'effectuent à partir de 200 mL de culture contenant l'antibiotique approprié à chaque souche et à chaque plasmide. Les cultures sont centrifugées à 4 000 x g à 20 °C pendant 10 min. La midipréparation est une chromatographie échangeuse d'anions ; elle s'effectue avec le kit Nucleobond Xtra de Macherey-Nagel. Le culot de cellules est resuspendu dans un tampon de resuspension composé de 50 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM d'EDTA et 100 µg/ml de RNase A. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide d'une solution composée de 200 mM de NaOH et 1 % de SDS permettant de dénaturer les ADN chromosomique et plasmidique. L'ajout d'un tampon de neutralisation composé de 2,8 M d'acétate de potassium à pH 5,1 permet de renaturer l'ADN plasmidique et de précipiter les débris cellulaires. La colonne du kit est, dans un premier temps, équilibrée avec un tampon d'équilibration contenant 100 mM de Tris, pH 6,3, 15 % d'éthanol, 900 mM de KCl, et 0,15 % de Triton X-100. L'échantillon est chargé sur la colonne puis le filtre est lavé avec un tampon composé de 100 mM de Tris, pH 6,3, 15 % d'éthanol, 1,15 M de KCl. L'élution s'effectue avec le même tampon à pH 8,5 et ne contenant qu'1 M de KCl, puis l'ADN est précipité par de l'isopropanol. L'ADN précipité est retenu sur un filtre 0,2 µm et lavé à l'éthanol puis à l'isopropanol. Le filtre est séché par des passages successifs d'air, puis l'ADN est resolubilisé et élué dans l'eau.

2.1.3.4. Extraction des génomes de *Pichia pastoris*

Le génome de la levure *P. pastoris* est extrait d'après un protocole établi par Marko Lõoke (Lõoke et al., 2011). Une colonie de levure est resuspendue dans 100 µL d'une solution d'acétate de lithium 200 mM, SDS 1 % (p/v) puis incubée 10 min à 70 °C. 300 µL d'éthanol 96 % (v/v) sont ajoutés, le contenu est mélangé au vortex puis centrifugé 10 min à 10 000 x g. Le surnageant est jeté et 500 µL d'éthanol 70 % (v/v) est ajouté pour resuspendre le culot, le tube est mélangé au vortex puis centrifugé 10 min à 10 000 x g. Le surnageant est jeté puis 100 µL d'eau sont ajoutés pour resuspendre le culot, puis vortexé, puis centrifugé 10 min à 10 000 x g. L'ADN génomique est alors dans le surnageant.

2.1.3.5. Extraction des ARN de *Pichia pastoris*

Les ARN totaux de la levure *P. pastoris* sont extraits avec le kit Monarch Total RNA miniprep kit de NEB à partir d'une culture de 4 mL de 48 h en milieu YPG.

Les cellules à $DO_{600} = 1,16$, soit $2,5 \times 10^7$ cellules, sont lysées par 5 cycles de 30 secondes au Bead-Beater avec 1 mL de billes de verre de diamètre 425-600 μm . Un volume équivalent de tampon de lyse est ajouté et l'échantillon est filtré à travers une première colonne pour retenir l'ADN génomique. Un volume équivalent d'éthanol absolu est ajouté et l'échantillon est filtré à travers une seconde colonne pour retenir les ARN totaux. Après une étape de lavage, la colonne est incubée 15 min à température ambiante en présence de DNase pour détruire les ADN résiduels. Après trois étapes de lavages, les ARN sont élués dans l'eau.

2.1.3.6. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

2.1.3.6.1. PCR

Les réactions de PCR s'effectuent en mélangeant 20 ng d'ADN avec 10 μM de chaque amorce, une solution de désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP) à 2 μM chaque et 0,1 U d'ADN polymérase dans un volume final de 12,5 μL .

La polymérase Q5 (New England Biolabs) agit dans son tampon. C'est une polymérase possédant une activité correctrice (*proof-reading*) 3'-5'. Le programme PCR commence par une étape de dénaturation de l'ADN à 95 °C pendant 5 min suivi de trente cycles de PCR. Un cycle comprend une étape de dénaturation de l'ADN à 95 °C pendant 30 s, puis une étape d'hybridation des amorces à 40 °C pendant 30 s et enfin une étape de polymérisation des dNTP à 72 °C pendant 90 s. Le programme se termine par 3 min à 72 °C. Le même programme est utilisé pour la *Taq polymerase* (Euromedex) qui est, elle, dépourvue d'activité d'édition, mais plus robuste. Par ailleurs, la *Taq polymerase* est utilisée pour rajouter des extrémités Adénylates aux fragments de PCR en vue de leur clonage dans le plasmide pGM[®]-T Easy. Lors de ce procédé qualifié de « *A-tailing* », l'enzyme est incubée dans son tampon en présence de MgCl_2 et de dNTP avec l'ADN cible à 72 °C pendant 20 min.

Notons ici l'usage de la *Taq polymerase* pour amplifier les ADNc de *C. subellipsoidea*, ceci n'a été possible qu'avec cette enzyme car elle est plus robuste et agit de façon plus efficace dans un milieu aussi complexe qu'un mélange d'ADNc totaux.

La polymérase *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* de Thermo Fisher Scientific est utilisée pour amplifier de façon ultra-spécifique des fragments d'ADN en vue de clonage. Le programme PCR commence par une étape de dénaturation de l'ADN à 95 °C pendant 5 min suivi de trente cycles de PCR. Un cycle comprend une étape de dénaturation de l'ADN à 95 °C

pendant 30 s, puis une étape d'hybridation des amorces à 60 °C pendant 30 s et enfin une étape de polymérisation des dNTP à 72 °C pendant 30 s (15 à 30 s/kb). Le programme se termine par 3 min à 72 °C.

Pour la mutagenèse dirigée : le kit GENEART® *Site-Directed Mutagenesis System* est utilisé avec la polymérase AccuPrime™ Pfx DNA polymerase. La réaction commence par une étape de méthylation de l'ADN (5 ng) par une méthylase à 37 °C pendant 20 min, suivie d'une étape de dénaturation de la méthylase et de l'ADN à 94 °C pendant 2 min. Dix-huit cycles ont lieu. Un cycle comprend une étape de dénaturation de l'ADN à 94 °C pendant 20 s, puis une étape d'hybridation des amorces à 57 °C pendant 30 s et enfin une étape de polymérisation des dNTP à 68 °C pendant 4 min et 30 s. Le programme PCR se termine par 5 min à 68 °C.

Les échantillons d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose de 0,8 à 2 %, selon la taille des fragments à séparer, contenant du bromure d'éthidium à 0,2 mg/L. La migration s'effectue pendant 15 à 25 min dans un tampon TAE composé de 40 mM de Tris-acétate, pH 8,0, 24,2 g de Tris Base, 5,71 mL d'acide acétique glacial et 1,81 g d'EDTA (pour 1 L). Les bandes d'ADN sont révélées sous UV grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé entre les bases nucléiques.

2.1.3.6.1.1. PCR chevauchante

La PCR chevauchante ou SOEING pour *Splincing by Overlapping Extension* consiste à polymériser un fragment d'ADN à partir d'une matrice constituée de deux brins d'ADN amplifiés par PCR et dont une partie est commune. Cette technique utilisée au cours du clonage de la CsPLD est utilisée pour joindre deux fragments d'ADN et les amplifier par PCR. La PCR contient les réactifs habituels dont deux amorces situées aux extrémités du fragment final et 10 ng de chaque fragment d'ADN purifié.

2.1.3.6.1.2. PCR nichée

La PCR nichée ou *nested PCR* est une technique permettant d'amplifier un fragment d'ADN minoritaire ou dont la spécificité des amorces empêche de l'obtenir en une seule PCR. C'est souvent le cas lorsque le milieu est riche en fragments nucléotidiques comme des ARNm rétrotranscrits en ADNc. Il s'agit ici de combiner deux PCR avec deux jeux d'amorces différents. Au cours de la première PCR de quinze cycles, les amorces s'hybrident complètement et sont donc très spécifiques de la cible. Un aliquote de cette PCR (1 µL) est

utilisé pour effectuer une seconde PCR cette fois-ci de trente-cinq cycles avec des amorces flanquantes contenant le site de restriction utilisé pour le clonage. Cette technique est utilisée dans le cadre du clonage de l'ADNc codant la CsPLD.

2.1.3.6.2. RT-PCR

La RT-PCR est une méthode qui permet de rétrotranscrire les ARN en ADNc grâce à une reverse transcriptase. Les ARN totaux (500 ng) sont incubés avec des random hexamer, des dNTP et de l'eau selon le protocole *SuperScript™ II reverse transcriptase* de Thermo Fisher. Les ARN sont tout d'abord dénaturés à 65 °C pendant 5 min, puis le tampon de la reverse transcriptase et le dithiothréitol (DTT) sont ajoutés et le tout est incubé à 25 °C pendant 2 min. Enfin la reverse transcriptase et l'eau sont ajoutées et incubées à 25 °C pendant 10 min, les ADNc sont synthétisés à 42 °C pendant 50 min, et l'enzyme est désactivée à 70 °C pendant 10 min. Les ADNc générés sont dilués 1/5 et utilisés pour la qPCR.

2.1.3.6.3. qPCR

Les amplicons de 100 pb sont produits au cours de 44 cycles de PCR de trois étapes précédées d'abord de 30 s de dénaturation à 95 °C : une étape de dénaturation de 6 secondes à 95 °C, une étape d'hybridation de 15 s à 60 °C et une étape de polymérisation de 25 s à 72 °C. Le mélange réactionnel contient 5 µL de iTaq Universal SYBR® green supermix (Bio-Rad) et 1 µL de chaque amorce (300 nM final). Les ADNc sont dilués au 1/25^{ème} et 2,5 µL sont ensuite ajoutés au mélange. Un fragment d'*AtPLD* (100 pb) est amplifié avec les amorces sens 5'-GCCTTGGCATGACATTCACCT-3' et anti-sens 5'-GAGCAAGCAGGGTGGTAAAG-3', et le gène de référence *ARG4* (Abad et al., 2010) est amplifié en parallèle avec les amorces sens 5'-GTGGGCAGAAGGGAAGTTTG-3' et anti-sens 5'-TTGGTCGTGGAATCTCTGGT-3'. L'authenticité des amplicons est confirmée par séquençage des produits de PCR. La quantification relative du nombre de copies est effectuée selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) avec $\Delta Ct = Ct$ de la cible (*AtPLD*) – Ct de la référence (*ARG4*).

2.1.3.7. Clonage des ADNc

2.1.3.7.1. Clonages des gènes issus de mutagenèse dirigée

Le plasmide pGAPZB-*AtPLD* est copié grâce aux amorces indiqués dans le Tableau 2 introduisant une mutation dans le gène *AtPLD*. Le plasmide pGAPZB contenant *AtPLD* α est

tout d'abord méthylé par une méthylase, de cette façon, lors de la transformation des produits de PCR, seuls les ADN non méthylés issus de la PCR et comportant donc la mutation vont rester dans les cellules, l'ADN méthylé sera dégradé par la souche d'*E. coli* DH5 α TM-T1^R. La mutagenèse dirigée a été effectuée avec le kit GENEART[®] Site-Directed Mutagenesis System. Le problème de cette technique de mutagenèse réside dans l'étape de recombinaison homologue de l'ADN linéaire amplifié en un plasmide circulaire, où des cas d'insertions multiples des amorces de PCR ont été observés au laboratoire. Le contrôle de l'absence de polyinsertions des amorces s'effectue tout d'abord par PCR à l'aide d'amorces flanquant le site muté, puis la mutation est vérifiée par séquençage de l'ADN plasmidique par la méthode des didésoxyribonucléotides (société Eurofins MWG).

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées.

Les bases mutées sont indiquées en italiques. Fwd désigne l'amorce sens et Rev désigne l'amorce antisens.

N°	Cible amplifiée par PCR	Séquence 5'-3'
325	AtPLD A35L Fwd	ATTCTGCTAAATGTAGAA
261	AtPLD A35L Rev	CTCTTCTACATTTAGCAGAATCTTGCC
262	AtPLD N36A Fwd	AAGATTCTGGCAGCTGTAGAAGAGACG
263	AtPLD N36 Rev	CGTCTCTTCTACA GCTGCCAGAATCTT
277	AtPLD AN36HM Fwd	GGCAAGATTCTG CATATGGTAGAAGAGACG
278	AtPLD AN36HM Rev	CGTCTCTTCTAC CATATGCAGAATCTTGCC
336	AtPLD K261A Fwd	CTCAAGAAGGCGGCTAGTGAA
337	AtPLD K261A Rev	TTCACTAGCCGCCTTCTTGAG
281	AtPLD H331A Fwd	ACTATGTTACGGCTCATCAGAAAATC
282	AtPLD H331A Rev	GATTTTCTGATGAGCCGTGAACATAGT
268	AtPLD H332A Fwd	ATGTTACGCATGCTCAGAAAATCGTT
269	AtPLD H332A Rev	AACGATTTTCTGAGCATGCGTGAACAT
270	AtPLD K334A Fwd	ACGCATCATCAGCAATCGTTGTTGTG
271	AtPLD K334A Rev	CACAACAACGATTGCCTGATGATGCGT
324	AtPLD D339A Fwd	GTTGTGGCCAGCGAGATGCCA
273	AtPLD D339A Rev	TGGCATCTCGCTGCCACAACAACGAT
274	AtPLD S348A Fwd	AGCAGAGGAGGAGCAGAAAATGAGGAGA
275	AtPLD S348A Rev	TCTCCTCATTTCTGCTCCTCCTCTGCT
304	AtPLD P401A Fwd	AAAGGTGGTGCAAGGGAGCCT
305	AtPLD P401A Rev	AGGCTCCCTTGCAACCACCTTT

306	AtPLD R402A Fwd	GGTGGTCCA G CGGAGCCTTGG
307	AtPLD R402A Rev	CCAAGGCTCC G CTGGACCACC
308	AtPLD P404A Fwd	CCAAGGGAG G CTTGGCATGAC
309	AtPLD P404A Rev	GTCATGCCAAG C CTCCCTTGG
310	AtPLD W405A Fwd	AGGGAGCCT G CGCATGACATT
311	AtPLD W405A Rev	AATGTCATGC G CAGGCTCCCT
312	AtPLD D407A Fwd	CCTTGGCATG C CATTCACTCC
313	AtPLD D407A Rev	GGAGTGAATG G CATGCCAAGG
279	AtPLD Q522A Fwd	TACGTTGAAAAC G CGTACTTCCTTGGG
280	AtPLD Q522A Rev	CCCAAGGAAGTAC G CGTTTTCAACGTA
401	AtPLD F565A Fwd	GGAGAGAAG G CCAGGGTCTAT
402	AtPLD F565A Rev	ATAGACCCTG G CCTTCTCTCC
287	AtPLD Y659A Fwd	CGTTTCATGATT G CCGTCCACACCAAA
288	AtPLD Y659A Rev	TTTGGTGTGGACG G CAATCATGAAACG
225	AtPLD H661A Fwd	ATGATTTACGTC G CCACCAAATGATG
226	AtPLD H661A Rev	CATCATTTTGGTG G CGACGTAAATCAT
227	AtPLD K663A Fwd	TACGTCCACACC G CAATGATGATCGTT
228	AtPLD K663A Rev	AACGATCATCATT G CGGTGTGGACGTA
285	AtPLD I666A Fwd	ACCAAATGATG G CTGTTGACGATGAA
286	AtPLD I666A Rev	TTCATCGTCAACAG C CATCATTTTGGT
229	AtPLD D668A Fwd	ATGATGATCGTTG C CGATGAATACATT
230	AtPLD D668A Rev	AATGTATTCATCG G CAACGATCATCAT
283	AtPLD D669A Fwd	ATGATCGTTGACG C TGAATACATTATC
284	AtPLD D669A Rev	GATAATGTATTCA G CGTCAACGATCAT
314	AtPLD G675A Fwd	ATTATCATTG C GTCTGCTAAC
315	AtPLD G675A Rev	GTTAGCAGAC G CAATGATAAT
266	AtPLD S676A Fwd	ATTATCATTTGGG G CTGCTAACATCAAC
267	AtPLD S676A Rev	GTTGATGTTAGCAG C CCAATGATAAT
316	AtPLD A677V Fwd	ATTGGGTCTG T TAACATCAAC
317	AtPLD A677V Rev	GTTGATGTTA A CAGACCCAAT
231	AtPLD N678A Fwd	ATTGGGTCTGCT G CCATCAACCAGAGG
232	AtPLD N678A Rev	CCTCTGGTTGATG G CAGCAGACCCAAT
318	AtPLD N680A Fwd	GCTAACATC G CCAGAGGTCA
319	AtPLD N680A Rev	TGACCTCTGG G CGATGTTAGC

320	AtPLD R682A Fwd	ATCAACCAGGCGTCAATGGAC
321	AtPLD R682A Rev	GTCCATTGACGCTGGTTGAT
322	AtPLD S683A Fwd	AACCAGAGGGCAATGGACGGT
323	AtPLD S683A Rev	ACCGTCCATTGCCCTCTGGTT
397	AtPLD D689A Fwd	GGTGCAAGAGCCTCTGAGATA
398	AtPLD D689A Rev	TATCTCAGAGGCTCTTGCACC
399	AtPLD E691A Fwd	AGAGACTCTGCGATAGCAATG
400	AtPLD E691A Rev	CATTGCTATCGCAGAGTCTCT
328	AtPLD P771A Fwd	CTCCGCTACGCGATCGGTGTA
329	AtPLD P771A Rev	TACACCGATCGCGTAGCGGAG
330	AtPLD G778A Fwd	GCCAGCGAAGCCGACATCACT
331	AtPLD G778A Rev	AGTGATGTGCGCTTCGCTGGC
332	AtPLD G798A Fwd	CGTATCCTCGCCACCAAATCA
333	AtPLD G798A rev	TGATTTGGTGGCGAGGATACG
359	AtPLD P805A Fwd	GACTACCTGCTCCAATCCTT
360	AtPLD P805A Rev	AAGGATTGGAGCCAGGTAGTC
363	AtPLD T809A Fwd	CCAATCCTTGCAACCTAAGCG
364	AtPLD T809A Rev	CGCTTAGGTTGCAAGGATTGG
365	AtPLD T809S Fwd	CCAATCCTTTCAACCTAAGCG
366	AtPLD T809A rev	CGCTTAGGTTGAAAGGATTGG
367	AtPLD T810A Fwd	ATCCTTACAGCCTAAGCGGCC
368	AtPLD T810A Rev	GGCCGCTTAGGCTGTAAGGAT

2.1.3.7.2. Clonage des domaines minimum

Les domaines minimums sont en amplifiant par PCR le gène sauvage codant *AtPLD α* avec des amorces (Tableau 3) réduisant successivement la longueur du gène en 5'. Les détails du clonage sont présentés en chapitre 2 des résultats (cf. 3.2. Chapitre 2 : Domaine catalytique minimal, maturation post-traductionnelle et inhibition de la PLD).

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour la construction et le séquençage des domaines minimums et de l'ATpLD fusionnée à une étiquette (His)₆. Les sites de restrictions sont soulignés et le codon start ou stop est en gras. Fwd désigne l'amorce sens et Rev désigne l'amorce antisens.

N°	Cible amplifiée par PCR	Séquence 5'-3'
241	AtPLD NΔ0 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG GCGCAGCATCTG
242	AtPLD NΔ35 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG AATGTAGAAGAGACGATGTT
243	AtPLD NΔ50 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG TATGCGACGATTGATCTG
244	AtPLD NΔ70 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG CCTAAGAACCCAAAGTGG
245	AtPLD NΔ152 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG GAGGATCGTAACTGGAAC
246	AtPLD NΔ164 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG AAGTTCCTGGAGTGCCA
405	AtPLD NΔ82 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG ATTTACTGTGCTCACTTGG
406	AtPLD NΔ93 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG ACTGTTAAAGATGATAATCCC
407	AtPLD NΔ106 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG GGAAGAGCTTACATTCCT
408	AtPLD NΔ119 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG GAGGAAGTGGATCAGTG
409	AtPLD NΔ141 Fwd	GGT <u>ACCGCGG</u> ATG ATTCATGTCAAGCTTCATATTT
222	AtPLD (His) ₆ Fwd	CTGGT <u>ACCGCGG</u> ATG TTGCACCATCACCATCACCAT ATG GCGCAGCATCTGTTGC
97	AtPLD Rev	TGCT <u>GCGGCCGCT</u> TTA GGTTGTAAGGATTGGAG
102	AtPLD Rev	TAGTTCTTCCCTCCAGC
387	AtPLD Rev	AAAAGAACCCTGACACCTT
21	Promoteur T7	TTAATACGACTCACTATAGG
369	Promoteur SP6	CATTTAGGTGACACTATAG
29	Promoteur pGAP	GGAAACCACCAGAATCG
55	Terminateur pGAP	GGCAAATGGCATTCTGACAT
113	AtPLD rev	CCTGAATCACATCCTTGAC

2.2. Analyse biochimique et structurale des PLDs

2.2.1. Bioinformatique

2.2.1.1. Recherche de séquences

Le tBLASTn est une méthode de recherche de séquences nucléotidiques traduites en protéines effectuée à partir d'une séquence protéique. Le BLAST pour *Basic Local Alignment Search*

Tool est un programme qui recherche des régions similaires entre les séquences. Le programme compare la séquence recherchée avec les séquences de la base de données et calcule le taux de correspondance (Altschul et al., 1990).

La recherche des séquences de PLD α s'effectue par tBLASTn de la base de données du NCBI avec comme cible la séquence de la PLD d'*A. thaliana*. Nous avons effectué une recherche de séquence protéique avec le mot-clé « PLD » dans la base de données PhytosomeDB v12.1 (Goodstein et al., 2012).

2.2.1.2. Modélisation de structures protéiques

Les structures secondaires sont prédites à l'aide du serveur PSIPRED v3.3 (*PSI-blast based secondary structure PREDiction*) (Jones, 1999).

Les modèles de l'*At*PLD avec ou sans domaine C2 sont obtenus avec les serveurs Phyre² (Kelley et al., 2015) et I-TASSER (Yang et al., 2015). Ces serveurs utilisent le principe de la modélisation par homologie. Le serveur Phyre² (Protein Homology/analogy Recognition Engine v2.0) recherche des homologues de séquence par PSI-BLAST (*Position-Specific Iterative-BLAST*) parmi les protéines dont la structure est connue. Il extrait la séquence de ces protéines homologues et réalise un alignement qui lui permet ensuite de modéliser la structure. Le serveur I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) utilise une approche hiérarchique pour prédire des structures. Basé sur le principe du « threading » ou identification de repliement, le serveur essaye de trouver des protéines avec un repliement similaire par portions de séquences. Puis, le serveur réassemble les fragments entre eux et minimise l'énergie des modèles qu'il a construits pour ne sélectionner que les meilleurs d'entre eux.

Les méthodes de « threading » visent donc à calculer l'adéquation entre une séquence de structure inconnue et une structure 3D connue, ou une partie de celle-ci. Les représentations des structures 3D sont effectuées avec le logiciel PymolTM v2.0.4.

2.2.2. Lipidomique

L'extraction des lipides a été effectuée en utilisant la méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959), modifiée par Ames (Ames, 1968). Cette extraction consiste à resuspendre l'échantillon dans un mélange chloroforme / méthanol / eau ou PBS (1/2/0,8, v/v/v), le mélange est conservé à température ambiante pendant 1 h. Ensuite, 1 mL d'eau ou PBS et 1 mL de chloroforme ont été rajoutés, et une centrifugation à 800 x g pendant 5 min a été faite pour

séparer la phase aqueuse de la phase organique. L'extrait récupéré et séché sous azote, puis repris dans 50 μL de chloroforme et analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques CCM (ALUGRAM[®]Xtra SIL G/UV254 (Macherey Nagel)).

Une migration en deux dimensions a été réalisée en utilisant une solution de chloroforme / méthanol / eau (65/25/4, v/v/v) pour le premier sens, et une solution chloroforme / méthanol / acide acétique (65/25/10, v/v/v) pour le second. Les lipides ont été révélés ensuite par exposition à l'iode.

2.2.2.1. Extractions des phospholipides de levure

Les cellules à $\text{DO}_{600} = 5$ dans un volume total de 1,6 mL de PBS sont placées dans un tube. Le méthanol (4 mL) et chloroforme (2 mL) sont ajoutés, le tube est vortexé et laissé au repos 1 h. Le chloroforme (2 mL) est ensuite ajouté puis 2 mL de PBS, après agitation au vortex deux phases se forment. Après centrifugation à 800 x g pendant quelques secondes, la phase organique est transférée dans un nouveau tube à l'aide d'une pipette Pasteur. Trois volumes de chloroforme-méthanol (2/1, v/v) sont ajoutés ainsi que 2 mL d'eau et 1 mL de chloroforme. De courtes centrifugations à 800 x g permettent de séparer les phases plus rapidement. La phase organique est transférée dans un nouveau tube et séchée sous un flux d'azote gazeux. Les phospholipides sont alors repris dans 500 μl de chloroforme-méthanol (2/1, v/v).

2.2.2.2. Extraction des triglycérides

Les cellules de *P. pastoris* à une $\text{DO}_{600} = 0,4$ sont centrifugées à 3 000 x g pendant 5 min. Le culot est repris dans une solution de dichlorométhane-méthanol (2/1, v/v). Après transfert dans un ballon, une pincée de billes de verre est ajoutée pour favoriser l'ébullition. Le montage est alors placé dans un bain-marie sous reflux pendant 45 min à 60 °C. Le solvant est filtré sur ouate puis séché au rotavap 30 min à 40 °C. Les TGs forment un film sur le ballon. Ils sont repris dans la solution de dichlorométhane-méthanol (2/1, v/v) et séchés sous un flux d'azote gazeux pour réduire le volume. La totalité des échantillons est déposée sur plaque de CCM, la migration s'effectue dans le dichlorométhane. Après révélation par exposition au diiode, on peut identifier les taches de TGs qui ont migré au niveau du témoin positif trioléine. La zone marquée par le diiode est grattée et reprise dans le dichlorométhane. Les échantillons sont alors filtrés sur entonnoir et coton et lavés avec du dichlorométhane. Enfin, les TGs purifiés sont séchés sous un flux d'azote gazeux pour concentrer l'échantillon.

2.2.2.3. Quantification des lipides

La quantification des lipides s'effectue à l'aide de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS). Les lipides totaux extraits comme expliqué précédemment (cf. 2.2.2. Lipidomique) ont été resuspendus dans 2,5 mL de méthanol. Par la suite, un aliquot de 200 μ L de chaque échantillon a été filtré et séché sous azote et resuspendu dans 200 μ L d'acétonitrile / méthanol / chloroforme (18/1/1, v/v/v), et 10 μ L de ce mélange ont été injectés dans la colonne pour analyse. Le système de LC est composé de deux pompes binaires LC-30AD, d'un échantillonneur automatique SIL-30AC et d'un four de colonne CTO-20AC Shimadzu. Les échantillons ont été séparés sur une colonne CORTECS HLIC de 2,7 μ m 4,6x150 mm de chez Waters. Le gradient d'élution utilisé contient deux solutions, A et B ; A est composée de d'acétonitrile/eau (95/5, v/v) avec 10 mM d'ammonium formate, et B d'acétonitrile/eau (50/50, v/v) avec 10 mM d'ammonium formate. La colonne a été équilibrée pendant 2 min avec 100 % de A avant l'injection des échantillons. Ensuite le pourcentage de A a été maintenu à 100 % pour 2 min, puis a été diminué de 100 à 50 % pendant 8 min en complétant avec B. Le débit est de 0,5 mL/min et la température de la colonne de 30 °C. Ces analyses ont été effectuées sur la plateforme lipidomique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL) à Villeurbanne.

2.2.3. Purification de protéines

2.2.3.1. Extraction des enzymes

Dans le cadre de la purification de *VuPLD*, l'enzyme est extraite à partir d'un litre de culture effectuée sur 4 jours, de la souche X33 de *P. pastoris* transformée par le vecteur pGAPZB-*VuPLD*. La culture est centrifugée à 4 000 x g pendant 5 min puis incubée 1 h à 30 °C dans un tampon de lyse contenant 10 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM de sucrose, et 150 mM de NaCl en présence de zymolyase 0,1 mg/mL afin de digérer la paroi cellulaire. La lyse mécanique des cellules s'effectue par 3 cycles de 3 min au sonicateur (cycle 0,5 et amplitude 70 %). Une dialyse sur une nuit est effectuée dans un tampon composé de 30 mM PIPES, pH 6,2, et 50 mM de CaCl₂. Ce protocole de lyse est appliqué également pour lyser les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'extrait cellulaire brut contenant l'*AtPLD* est obtenu par broyage au *Bead-Beater*. Le culot de cellules est lavé dans un tampon NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0, 300 mM NaCl puis 1 mL de billes

de verre 425-600 μm de diamètre est ajouté. Le broyage s'effectue par un cycle de 5 fois 30 s avec des temps de repos dans la glace afin de minimiser l'effet de la chaleur dégagée par le broyage. L'extrait protéique brut est ensuite obtenu par récupération du surnageant après 2 min de centrifugation à 5 000 x g.

2.2.3.2. PLD de *Vigna unguiculata*

2.2.3.2.1. Chromatographie sur colonne d'Octyl-Sépharose[®]

La rétention spécifique de la PLD sur une résine d'Octyl-Sépharose[®], en présence de Ca^{2+} , constitue l'étape clé de la purification. L'extrait protéique est homogénéisé dans un tampon contenant 30 mM de PIPES, pH 6,2, et 50 mM de CaCl_2 , puis est appliqué directement sur la colonne pré-équilibrée dans le même tampon. La PLD est éluée par application d'un tampon contenant 10 mM de PIPES, pH 6,2, et 0,1 mM d'EDTA avec un débit de 1 mL/min. Les fractions collectées (5 mL par fraction) sont analysées par SDS-PAGE et la quantité de protéines est évaluée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les fractions contenant l'activité PLD sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration (cf. ci-après) puis congelées à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à l'analyse par chromatographie par filtration sur gel (Arhab et al., 2018).

2.2.3.2.2. Chromatographie par filtration sur gel

La chromatographie par filtration sur gel est une chromatographie d'exclusion qui utilise une matrice de composés sphériques ($\sim 13\text{ }\mu\text{m}$) d'agarose et de dextran réticulés. La solution protéique de PLD est déposée sur la colonne *Superdex S200* ou *Superdex S200 increase* (10x300 mm) pré-équilibrée dans le tampon contenant 10 mM de PIPES, pH 6,2, 0,1 mM d'EDTA et 50 mM de NaCl. La séparation des protéines s'effectue avec le même tampon à débit constant de 0,5 mL/min. Des fractions de 250 μL sont collectées puis analysées par SDS-PAGE.

2.2.3.3. PLD d'*Arabidopsis thaliana*

La colonne Ni-TED est une résine de silice chargée d'ions Ni^{2+} fixés sur des groupements TED (*tris carboxymethyl ethylene diamine*). Ce type de résine, qui permet d'effectuer une chromatographie d'affinité en fixant les étiquettes polyhistidines *via* les ions Ni^{2+} , présente un seul site de fixation rendant la purification plus spécifique au détriment de la quantité de protéines purifiées. L'extraction des protéines recombinantes s'effectue en condition native après lyse des cellules dans le tampon NaH_2PO_4 50 mM, pH 8,0, 300 mM NaCl. Les protéines

sont ensuite séparées par chromatographie sur la colonne Ni-TED. Après lavage de la colonne, les protéines immobilisées sont éluées par le même tampon contenant 250 mM d'imidazole, pH 8,0.

Le même type de purification est effectué sur la colonne Ni-IDA qui est une résine de silice chargée d'ions Ni^{2+} fixés sur des groupements IDA (*iminodiacetic acid*). Ce type de résine équivalent à la précédente, propose trois sites de fixation. Ainsi, à l'inverse du Ni-TED une plus grande quantité de protéines est purifiée mais plus d'impuretés sont présentes.

Une variante de ce protocole utilise le tampon de lyse plus adapté à la mesure de l'activité PLD. En condition native les cellules sont lysées dans le tampon de lyse contenant 10 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM de sucrose, 150 mM de NaCl. Le protocole de purification est le même que précédemment. L'éluion s'effectue avec le tampon de lavage mais contenant 250 mM d'imidazole à pH 8,0.

Les purifications en conditions dénaturantes s'effectuent dans les mêmes conditions avec un tampon contenant, en plus, 8 M d'urée.

2.2.3.4. Concentration de la protéine

La concentration des échantillons protéiques s'effectue sur un Amicon[®] contenant une membrane de porosité 30 kDa, afin de réduire le volume d'échantillon à quelques centaines de microlitres ; un Amicon[®] de porosité 10 kDa est utilisé quant à lui pour concentrer dans une gamme de volume typiquement de l'ordre de la centaine à la dizaine de microlitres. La concentration s'effectue par plusieurs étapes de 5 min de centrifugation à 4 000 x g pour les gros volumes, puis à 14 000 x g pour les petits volumes. La V_u PLD est concentrée dans un tampon contenant 10 mM de PIPES, pH 6,2, 0,1 mM d'EDTA et 50 mM de NaCl.

2.2.3.5. Dosage 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, a la propriété de se lier aux résidus basiques et hydrophobes des protéines. Cette interaction aboutit à un déplacement du maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm. La quantité de protéines est calculée par rapport à une gamme de référence effectuée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA), dans les mêmes conditions expérimentales. Le dosage est adapté en microplaque où le milieu réactionnel de 10 μL est mélangé à 200 μL de réactif de Bradford 5 fois dilué.

2.2.4. Mesure de l'activité enzymatique

L'ensemble des tests enzymatiques présentés ci-après reposent sur la détection des produits de la réaction d'hydrolyse, la choline ou le PA.

L'enjeu majeur pour tester l'activité PLD dans des conditions catalytiques optimales est la préparation du substrat qui, dans le cas des lipases et phospholipases, est insoluble. La PC en solution chloroformique est séchée sous un flux d'azote puis dispersée par sonication dans une solution de SDS/Triton X-100 en proportion équimolaire (3.1 mM chaque).

2.2.4.1. Test chromogénique

La choline libérée sous l'action catalytique de la PLD sur la PC peut être dosée spectrophotométriquement par une cascade enzymatique faisant intervenir la choline oxydase et la peroxydase. Ce test chromogénique est utilisé en point final et réalisé sur plaques de microtitration en utilisant un spectrophotomètre TECAN Infinite M200. Dans un volume réactionnel de 100 μ L, le substrat (0,4 mM), composé de micelles mixtes de DMPC et SDS/Triton X-100 est mélangé à la solution enzymatique. La réaction est démarrée par ajout de Ca^{2+} à 20 mM final et le mélange est incubé à 30 °C pendant 10 min. La réaction est ensuite interrompue en ajoutant le mélange (50 μ L) contenant 16,6 mM de Tris/HCl (pH 8), 1,67 mM de 4-aminoantipyrine, 9 mM de l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonique, 83,3 mM d'EDTA, 3,3 U de peroxydase et 1,67 U de choline oxydase (concentrations finales).

L'EDTA permet de chélater les ions calcium en solution et de stopper ainsi la réaction. La choline libérée est oxydée par la choline oxydase, puis l' H_2O_2 formé est transformé par la peroxydase qui oxyde le 4-aminoantipyrine et l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonique pour former un chromogène rouge/rosé dont la mesure de l'absorbance est suivie à 500 nm. Une gamme étalon est effectuée avec de la choline dans les mêmes conditions expérimentales. Cette gamme de choline est linéaire pour des quantités de choline comprises entre 0 et 5 nmol.

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.

2.2.4.2. Tests fluorescents

2.2.4.2.1. Dosage de la choline

La choline libérée sous l'action catalytique de la PLD sur la PC peut être dosée par la formation d'un composé fluorescent faisant intervenir la choline oxydase et la peroxydase. La choline est oxydée par la choline oxydase, puis l' H_2O_2 formé est transformé par la peroxydase qui oxyde le (N-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (*Amplex Red*) pour former la résorufine fluorescent à 590 nm.

Dans un volume réactionnel de 100 μL , le substrat (0,4 mM) composé de micelles mixtes de DMPC et SDS/Triton X-100 est mélangé à la solution enzymatique en présence de 50 mM de Tris/HCl et de 20 mM CaCl_2 . Après incubation de 10 min, la quantité de choline libérée dans le milieu est ensuite dosée par l'ajout d'une solution contenant l'*Amplex red* (62 μM), la peroxydase (0,1 U) et la choline oxydase (0,1 U). L'excitation de la molécule de résorufine à 550 nm permet le suivi de la fluorescence à 590 nm.

2.2.4.2.2. Dosage du PA

Le dosage du PA est effectué par le test fluorescent utilisant la 8-hydroxyquinoléine (8-HQ) et développé au laboratoire (Rahier et al., 2016b). Le PA libéré sous l'action de la PLD sur les phospholipides se complexe à la sonde 8-HQ *via* un ion calcium. Ceci permet d'augmenter la fluorescence intrinsèque de la sonde.

Le substrat (1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine ou POPC), dans une solution chloroformique à 40 nmol est séché sous un flux d'azote puis repris dans 130 μL d'une solution composée de Tris 50 mM pH 8, SDS 0,7 mM, Triton X-100 1 mM et de 8-HQ 66 μM . Cette solution est dispersée par sonication pendant 10 min. La réaction enzymatique est démarrée par ajout de l'enzyme (ou enzyme + inhibiteur) et le CaCl_2 20 mM. La sonde est excitée à 366 nm et la fluorescence est mesurée à 490 nm (Rahier et al., 2018).

2.2.4.2.3. Criblage d'inhibiteurs

Le criblage de la chimiothèque de l'ICBMS s'effectue avec la PLD de *V. unguiculata* purifiée à homogénéité (cf. 2.2.3.2.1. Chromatographie sur colonne d'Octyl-Sépharose®). Les molécules sont conservées dans le DMSO et testées à 33 μM dans 3 % de DMSO final. Cette concentration de DMSO est sous la limite (5 %) au-delà de laquelle on observe un effet du

DMSO sur l'activité enzymatique de *Vu*PLD. Lors du criblage, le témoin positif est constitué de *Vu*PLD en présence de DMSO 3 %. Deux témoins négatifs sont utilisés : un témoin négatif d'inhibition PLD en présence du Vanadate 66 μ M dans le DMSO 3 %, et un témoin négatif de fluorescence sans enzyme qui nous permet d'évaluer la fluorescence basale du substrat en présence de la sonde 8-HQ utilisée dans le test enzymatique.

2.2.5. Analyse des protéines par SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de SDS (SDS-PAGE) permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire dans un champs électrique.

Les diverses fractions protéiques sont analysées par SDS-PAGE à 10 % (Laemmli, 1970). Les échantillons sont mélangés à un tampon Laemmli contenant 40 mM de Tris/HCl, pH 6,8, 2 % de SDS, 20 % de glycérol, 1,7 % de β -mercaptoéthanol et 0,002 % de bleu de bromophénol, puis les protéines sont dénaturées à 95 °C pendant 5 min. Les protéines sont ensuite concentrées sur un gel de concentration composé de SDS 0,1 %, de 390 mM de Tris/HCl, pH 6,8, d'acrylamide 5 %, de persulfate d'ammonium 0,1 % et de TEMED. La migration s'effectue à 90 V pendant 20 min. Les protéines accumulées en bordure du gel de séparation 10 % composé de 125 mM de Tris/HCl, pH 8,8, de SDS 0,1 %, d'acrylamide 10 %, de persulfate d'ammonium 0,1 % et de TEMED, sont séparées à 130 V pendant 1 h. Le tampon de migration utilisé pour le SDS-PAGE est composé de 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1 % de SDS, pH 8,3. Après migration, les protéines sont colorées par une solution de bleu de Coomassie composée de 50 % d'éthanol, 10 % d'acide acétique et de 0,1 % de bleu de Coomassie R250. La solution de décoloration est composée de 10 % d'éthanol et 7 % d'acide acétique.

2.2.6. Transfert des protéines sur membrane et révélation par immunoempreinte

Après migration sur gel SDS-PAGE et séparation des protéines selon leur masse moléculaire, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane de nitrocellulose est incubée au préalable 10 min dans le tampon de transfert composé de Tris 25 mM, de glycine 192 mM et de 20 % d'éthanol. Le transfert s'effectue à 250 mA pendant 1 h 30 dans un tampon de transfert glacé et une cuve placée dans un bac à glace. Les sites non occupés par les protéines sur la membrane sont saturés pendant 1 h à température ambiante sous agitation dans un tampon TBST (Tris-buffered saline-Tween) composé de Tris 50 mM, de NaCl

150 mM, de Tween 20 0,1 % (v/v) et supplémenté en BSA à 5 % (p/v). La membrane est incubée par la suite avec l'anticorps primaire (Tableau 4) toute la nuit à 4 °C dans un tampon TBST supplémenté en BSA 1 % sous agitation. La membrane est ensuite lavée 4 fois pendant 5 min dans un tampon TBST sous agitation forte puis incubée pendant 1 h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dans un tampon TBST sous agitation. L'anticorps secondaire est un anti-IgG de lapin généré chez la chèvre (Sigma) et couplé à la peroxydase de raifort. Celui-ci est utilisé dilué au 1/10 000^{ème}. La membrane est lavée 3 fois 10 min dans le TBST afin d'éliminer l'excès d'anticorps.

La révélation s'effectue avec le kit *Amersham ECL (Enhanced Chemical Luminescence) Western blotting detection reagents and analysis system* de GE Healthcare Life Sciences. La membrane est incubée 90 secondes dans un mélange d'une solution de luminol et de H₂O₂. Après oxydation par la peroxydase, le luminol est dans un état excité qui se résorbe avec émission de lumière. La présence de phénol permet d'augmenter l'intensité du signal et la durée d'émission. Le signal lumineux est capté par apposition d'un film photographique pendant 10 à 20 secondes.

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés

Anticorps	Cible	Dilution	Origine	Révélation
Anti (His) ₆	Tag (His) ₆	1/5 000 ^{ème}	Souris (Sigma)	Couplage avec la HRP
27KS3	PLD α de soja	1/500 ^{ème}	Lapin (2000)	Avec un Ac secondaire
Anti-C2	Domaine C2 d' <i>At</i> PLD α	1/5 000 ^{ème}	Lapin (2018)	Avec un Ac secondaire

2.3. Outils d'analyse structurale

2.3.1. SEC/MALS

L'expérience de SEC/MALS pour *Size Exclusion Chromatography/Multi Angle Light Scattering* est une méthode de mesure de la lumière diffusée par la protéine en solution à différents angles. Cette méthode est couplée à une chromatographie d'exclusion. Le SEC/MALS repose sur deux principes basiques en diffusion de lumière à savoir :

- la quantité de lumière diffusée (I) est directement proportionnelle (\propto) au produit de la masse molaire (M) par la concentration (c) ;
- la variation angulaire de la lumière diffusée (θ) est directement corrélée à la taille de la molécule.

L'intensité de lumière diffusée en fonction de la masse molaire de la protéine et de sa concentration est exprimée par l'équation simplifiée suivante :

$$I(\theta)\text{diffusé} \propto Mc(dn/dc)^2$$

$I(\theta)$ diffusé est l'intensité de lumière diffusée selon l'angle θ , M la masse molaire, c la concentration de l'échantillon, dn la variation de l'indice de réfraction et dc la variation de la concentration.

L'indice de réfraction est directement relié à la polarisabilité de la matière et donc à la quantité de lumière qu'elle diffuse. La variation de l'indice de réfraction avec la concentration est mesurée pour un soluté afin de déterminer la quantité de lumière qu'une certaine quantité de soluté va diffuser.

Au SEC/MALS, après séparation des protéines par chromatographie d'exclusion, celles-ci passent dans un refractomètre qui mesure dn/dc . Elles passent ensuite dans un diffusionmètre qui mesure la diffusion de lumière à plusieurs angles.

Les molécules qui ont un rayon de gyration (R_g) inférieur à 10 nm ne voient pas leur intensité de lumière modifiée en fonction de l'angle, ce qui n'est pas le cas des molécules avec un R_g supérieur à 10 nm. Pour ces molécules, l'intensité I diminue avec l'augmentation de l'angle, il est donc nécessaire de mesurer à plusieurs angles pour déterminer la « *scattering function* » ou fonction de diffusion.

La méthode de SEC/MALS permet donc de déterminer la masse absolue d'une protéine en solution. Les molécules sont séparées par chromatographie d'exclusion. La colonne est équilibrée dans le tampon de la protéine (cf. 2.3.1. SEC/MALS) puis calibrée avec de la BSA à 5 mg/mL. Les protéines (75 μ g) sont déposées sur la colonne avec un débit de 0,45 mL/min. Des fractions de 300 μ L sont collectées.

2.3.2. Cristallographie

2.3.2.1. Principe

La cristallographie consiste à former un cristal de protéine. Un cristal est caractérisé par un arrangement périodique et ordonné d'un motif, dans notre cas constitué d'une ou de plusieurs protéines, se répétant à l'identique d'une maille à l'autre.

Il s'agit donc de concentrer progressivement une protéine dans une phase soluble jusqu'à un changement d'état vers une phase solide et ordonné. C'est-à-dire remplacer les interactions protéines-solvant par des interactions protéines-protéines organisées.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce phénomène :

- la concentration de la protéine, sa pureté et son homogénéité
- la température et le pH de la solution tampon ainsi que la nature de ses composants
- la nature des agents précipitants, on en distingue trois types :
 - les polymères comme le PolyEthylène Glycol (PEG) qui excluent le solvant au voisinage de la protéine
 - les sels qui vont modifier la force ionique, et à la concentration utilisée excluent le solvant par « *salting out* », favorisant ainsi les interactions protéine-protéine hydrophobes. Il s'agit donc de sels non chaotropiques qui n'interagissent pas avec les protéines et n'induisent pas leur dénaturation.
 - les solvants organiques diminuent la constante diélectrique de la solution et donc le pouvoir de solvatation de l'eau diminuant ainsi la solubilité des protéines.

La combinaison de ces facteurs et leur optimisation s'effectue au sein d'un criblage de conditions de cristallogenèse et constitue une étape clé du processus d'étude cristallographique.

La cristallogenèse s'effectue par la méthode de diffusion de vapeur au cours de laquelle les interactions solvant-protéine sont remplacées progressivement par des interactions protéine-protéine. Un équilibre s'établit progressivement entre la solution de cristallisation en excès dans un réservoir et une goutte contenant la protéine concentrée. La diffusion de la vapeur d'eau, de la goutte vers le réservoir, permet une concentration lente de la protéine ; ceci conduit soit à la formation de cristaux à partir de la zone de nucléation soit à la précipitation.

Une fois les cristaux obtenus, ceux-ci sont pêchés et rapidement plongés dans une solution de cryoprotection qui va éviter au cristal de se déshydrater. Le cristal est plongé dans l'azote liquide afin de vitrifier l'eau et empêcher la formation de cristaux de glace.

La diffraction aux rayons X de ce cristal par les électrons des atomes de la protéine cristallisée produit des interférences constructives qui permettent l'amplification du signal de diffraction.

Ainsi, sur un cliché de diffraction chaque tache est caractérisée par :

- une position ;
- une intensité.

La position et l'intensité peuvent être mesurées directement sur chaque tache, cependant, l'information de phase est perdue au cours du passage de la 3D du cristal à la 2D du détecteur.

Il s'agit donc de « phaser » le signal de diffraction, plusieurs techniques sont envisageables, nous en développerons trois :

- le remplacement moléculaire : le but de cette méthode est d'estimer la phase de la nouvelle structure à partir d'une structure homologue existante (protéine cristallisée ou modélisation). Les structures étant proches, il est alors possible d'approximer des clichés de diffraction similaires à ceux de la protéine de structure inconnue. La structure du modèle étant connue il s'agit alors d'utiliser la même information de phase pour phaser le signal de la protéine de structure inconnue.
- le remplacement isomorphe multiple (MIR) : il s'agit ici de collecter un jeu de données avec un cristal et un autre jeu avec un second cristal au préalable trempé dans une solution d'atomes lourds ou bien obtenu dans une condition de cristallogenèse qui contient un atome lourd (Pt, Hg, Sm, Yb, Pb, Au). La soustraction des deux signaux (natif et dérivé) permet de retrouver l'information de phase.
- la dispersion anormale multiple (MAD) : il s'agit ici de faire diffracter un cristal avec deux longueurs d'onde de rayon X différentes dont l'une est proche de l'énergie d'absorption d'un atome lourd intégré dans la structure. Cette technique requiert un certain nombre d'atomes lourds dans la structure comme le sélénium intégré en lieu et place des atomes de soufre de la méthionine. La différence des deux jeux de données obtenus sur un cristal permet de connaître l'information de phase.

2.3.2.2. Criblage de conditions de cristallisations

Le criblage des conditions de cristallisation s'effectue avec le robot Mosquito de la plateforme de cristallogenèse de l'UMS 3444/IBCP de la SFR Bioscience Gerland-Lyon Sud, dans des plaques de 96 puits par la technique de diffusion de vapeur en goutte assise (*sitting drop*). Les gouttes contiennent 100 nL de protéine concentrée à 7 mg/mL et 100 nL de solution de cristallisation. Les plaques de 24 puits, réalisées à la main, permettent de cribler autour des conditions ayant donné des pistes de cristallisation par la technique de diffusion vapeur en goutte suspendue (*hanging drop*). Les gouttes contiennent alors 1 µL de protéine concentrée et 1 µL de solution de cristallisation. La visualisation des cristaux s'effectue avec le système Rock

Imager[®] pour les boîtes faites au robot, les boîtes faites manuellement sont observées sous une loupe binoculaire.

Avant diffraction aux rayons X les cristaux sont pêchés et trempés dans une solution de congélation contenant 0,1 M de tris sodium citrate pH 5,6, 10 % d'isopropanol, 25 % de PEG 4000 et 30 % de PEG 400.

2.3.3. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Le SAXS pour *Small Angle X-Ray Scattering* est une technique de mesure de la diffusion de rayons X à travers une solution de protéine. Elle permet l'analyse structurale, l'étude de processus cinétiques, de transitions structurales ou de changements conformationnels des macromolécules biologiques en solution (Figure 21). Cette méthode ne requiert pas de cristaux et n'est pas limitée par la taille de la macromolécule ce qui la rend applicable dans des conditions physiologiques.

Cependant, on ne mesure pas comme en cristallographie d'interférences constructives car la protéine est en solution et les particules ont une orientation aléatoire, ainsi la résolution est beaucoup moins importante et ne permet que de comprendre la forme globale de la protéine et des changements de domaines importants.

Tout d'abord les rayons X diffusent à travers l'objet en solution, on peut donc collecter des vecteurs de diffusion avec leurs intensités diffusées $I(q)$ (Figure 21A). Ces intensités $I(q)$ peuvent être représentés en fonction de la taille des vecteurs q (nm) ce qui donne lieu à une courbe de diffusion puis, par traitement mathématique, à une fonction de distribution des distances $P(r)$ qui rend compte du R_g de la protéine ainsi que de la distance maximale de celle-ci (Figure 21B). Cette même fonction de distribution $P(r)$ permet alors de modéliser l'enveloppe de la protéine (Figure 21C).

Une condition importante du SAXS est l'homogénéité de la protéine en solution, le moindre agrégat, d'une taille plus importante que la protéine, va diffuser beaucoup de rayons X et ainsi augmenter l'intensité du signal aux petits angles. Nous avons déjà observé le caractère homogène de la PLD en solution par la méthode de SEC/MALS, cependant certaines préparations avaient une tendance importante à précipiter à de faibles concentrations. Ainsi, pour réaliser les expériences de SAXS on effectue d'abord une chromatographie par filtration sur gel de l'échantillon protéique pour exclure les agrégats. La protéine est utilisée à une concentration minimale de 1 mg/mL.

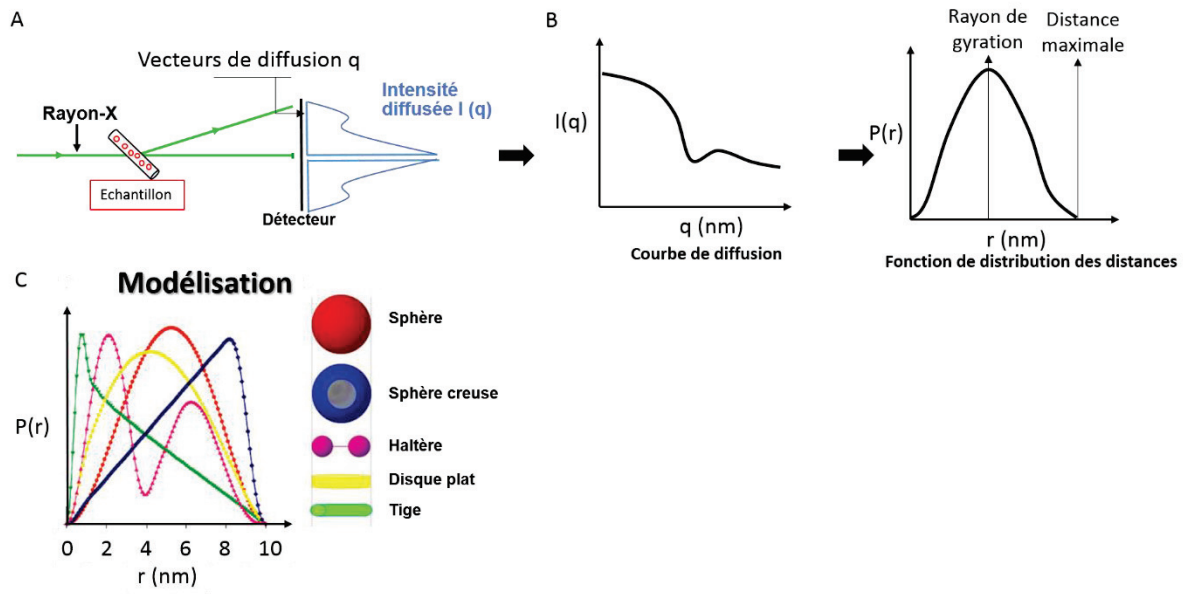


Figure 21 : Principe de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) (d'après (Svergun and Koch, 2003)).

3. Résultats & discussion

**3.1. Chapitre 1 : Analyse théorique et
expérimentale de la relation structure-fonction
des phospholipases D végétales**

Les PLD sont des enzymes centrales dans le métabolisme lipidique et dans la signalisation intracellulaire. Elles participent à la dynamique des membranes biologiques en générant du PA et donc en introduisant des charges négatives et des courbures ou bien en générant des phosphatidylalcool et donc en modifiant les propriétés biochimiques des membranes. Elles ont donc une action à la fois sur la structure et la biochimie des membranes. Or c'est *via* les membranes que les cellules s'échangent des informations, c'est *via* cette interface que communique et s'échange le vivant.

Si l'on a vu en introduction que l'absence de PLD n'était en général pas fatale à un organisme, on note cependant qu'un bouleversement biochimique de la régulation de ces enzymes peut entraîner une dérégulation globale des voies métaboliques de la cellule et ainsi modifier sa biochimie. C'est pour cela que la PLD est impliquée dans des pathologies majeures comme des cancers par exemple. Par ailleurs, et c'est le fruit des travaux que nous allons développer par la suite, ces enzymes qui ne paraissent pas indispensables à l'équilibre métabolique sont pourtant présentes chez tous les organismes vivants.

L'étude du fonctionnement, de la régulation et de la structure des PLD est indispensable à la compréhension de ces enzymes, étape nécessaire pour pouvoir apprécier l'étendue de leur implication dans le métabolisme et la biochimie cellulaire.

3.1.1. Mutagenèse dirigée de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*

En 1997, l'équipe de Xuemin Wang a produit une lignée d'*A. thaliana* avec un gène antisens dirigé contre la PLD α . Ce faisant ils ont aboli dans sa quasi-totalité l'activité PLD des plants d'*Arabidopsis* (Pappan et al., 1997). Par ailleurs, la purification de la PLD à partir des tissus par chromatographie sur Octyl Sépharose[®] ne donne lieu qu'à la purification de l'isoforme α . Ces deux expériences ont alors permis de déterminer que l'isoforme α était majoritaire chez les végétaux.

Au cours de ces travaux, nous utilisons donc comme modèle de référence la PLD α d'*A. thaliana* (*At*PLD α). Les débuts de l'étude de l'*At*PLD α remontent à 1995 (Dyer et al., 1995) avec son clonage à partir d'ARNm, et 1997 (Pappan et al., 1997) avec son expression dans *E. coli*. Notons que jusqu'à présent les études enzymologiques et fonctionnelles sur les PLD se sont concentré sur les PLD α issues d'organismes végétaux pour lesquels (chou (Abousalham et al., 1993; Lambrecht and Ulbrich-Hofmann, 1992), soja (Abousalham et al., 1995), ricin (Wang et al., 1994), tournesol (Abousalham et al., 1997a)) il a été possible de mesurer l'activité PLD sur un

extrait brut et de purifier à homogénéité l'enzyme. Ainsi, la base de l'enzymologie des PLD d'organismes dits supérieures s'étant effectuée historiquement sur les PLD végétales, les organismes ci-dessus sont devenus les modèles du genre. Ces modèles ont demeuré même après l'expression des premières PLD végétales recombinantes dans les années 1995-2000. Il est encore courant de voir des équipes comme les Allemands de l'université Martin Luther de Hall-Wiettemberg travailler sur la PLD de chou clonée dans *E. coli* (Lerchner et al., 2006).

Il est très difficile de purifier l'*AtPLD α* à partir du tissu végétal ; il semble en effet que l'activité spécifique et/ou le niveau d'expression de cette enzyme soit bien moindre que chez le chou par exemple. Au laboratoire, des tentatives ont eu lieu et, si l'enrichissement en PLD est possible, aucune purification du niveau atteint chez les végétaux précédemment cités n'a été réalisable. L'isoforme α de la PLD d'*A. thaliana* a déjà été clonée (Dyer et al., 1995), cependant toutes nos tentatives d'expression dans *E. coli* ont été infructueuses. Nous avons donc transféré ce gène dans un système eucaryote propice à l'expression recombinante des PLD végétales, la levure *P. pastoris* (Ben Ali et al., 2007). Ajoutons ici que ce gène gracieusement mis à notre disposition par l'équipe de Xuemin Wang elle-même contient les mutations suivantes R26M, A218T, L323S, I498T, et E580 par rapport à la séquence référente contenue en base de données AT1G52570.

Le système d'expression *P. pastoris* possède un triple intérêt :

- d'une part nous pouvons exprimer de façon recombinante une enzyme eucaryote dans un système eucaryote. Des données montrent en effet que les PLD subissent des modifications post-traductionnelles. En effet, des glycosylations sont détectées sur l'enzyme purifiée à partir du tissu végétal (Abousalham et al., 1995) ou bien à partir du système recombinant *P.pastoris* (Ben Ali et al., 2007) ;
- d'autre part, le niveau d'expression nous permet de mesurer une activité PLD dans l'extrait brut soluble des cellules lysées, en comparaison avec un témoin transformé par le vecteur vide où l'on ne détecte pas d'activité. Ceci est possible avec des tests enzymatiques simples et adaptables au haut débit ;
- ce système d'expression recombinante eucaryote nous permet de purifier environ 1 mg de PLD pure/L de culture afin d'étudier sa structure 3D.

La technique de mutagenèse dirigée (cf. 2.1.3.6.1. PCR et 1.3.3.10. Modulation de l'activité PLD par mutagenèse dirigée) permet de modifier dans l'ADN spécifiquement un ou des

nucléotides à l'aide d'oligonucléotides synthétiques. Ceci rend donc possible l'expression d'une protéine mutée et s'effectue par PCR avec des amorces contenant la mutation.

Ainsi dans un premier temps, une étude *in silico* nous permet de cibler des résidus conservés qui seront, dans un second temps, mutés et remplacés par un résidu alanine. Nous testerons alors l'activité catalytique des mutants et l'expression des protéines mutées afin de déterminer leur implication potentielle dans l'activité et la stabilité structurale de l'enzyme.

3.1.1.1. Criblage *in silico* des PLD végétales

Toutes les séquences obtenues, leur base de donnée de provenance et leur identifiant sont indiquées en Tableau 7 en Annexe.

De façon à cibler les résidus les plus conservés chez les PLD α végétales au cours de l'évolution, nous avons rassemblé un maximum de séquences issues des bases de données.

En utilisant la séquence de l'*At*PLD α nous avons effectué un tBLASTn de la base de données du NCBI (cf. 2.2.1.1. Recherche de séquences). Nous avons effectué une recherche de séquence protéique avec le mot-clé « PLD » dans la base de données PhytosomeDB v12.1. Les séquences, qui correspondent à 45,5 % (95/209) du nombre total de séquences, nous ont alors permis de déterminer des critères pour discriminer les PLD α des autres isoformes dont l'annotation en base de données n'est pas toujours juste :

- Le premier critère pour sélectionner les séquences est la longueur en acides aminés. Ne sont conservés dans notre criblage que les séquences comprises entre 800 et 840 résidus, entre la méthionine initiale et le codon stop. Ainsi tous les fragments de séquence sont exclus et ceci explique l'absence de séquences protéiques de certains organismes comme *Secale cereale* dont seuls des fragments de PLD α existent.
- Le second critère a été plus compliqué à établir puisqu'il s'agit de séquences reconnaissables spécifiques à l'isoforme α des PLD végétales qui nous permettent donc d'exclure les autres isoformes. Ainsi de l'amino-terminal au carboxy-terminal :
 - (a) l'isoforme α des PLD végétales contient une séquence consensus HGX₅I en aval de la méthionine initiale,
 - (b) entre les résidus 220 et 240 l'isoforme présente une séquence de type (I/V)(Y/C)(I/V)XGWS(V/I),
 - (c) puis une séquence de type (M/V)XT(H/G)D,
 - (d) un premier site catalytique HKD de type HXKX₄D,

- (e) un motif conservé (F/Y)(I/V)Y(I/V)ENQYF(L/I)GX₄W autour du résidu 520 avec une séquence caractéristique (Y/F)(I/V)XAIRXA en amont,
- (f) un second site catalytique HKD de type HXXK₄D
- (g) une séquence consensus finale PX₂(L/I)T(T/S).
- Le troisième et dernier critère est l'épissage des séquences. La séquence d'une enzyme active est connue et les premiers alignements confirment la position relative des exons que l'on peut trouver en base de données où l'épissage est réalisé automatiquement. Il se trouve que pour certaines séquences cet épissage *in silico* est mal réalisé et des introns subsistent. Quand ceux-ci sont identifiables nous avons donc corrigé manuellement les séquences. C'est le cas pour vingt-cinq séquences telles que :

- *Aegilops sharonensis* et *A. speltoides*, *Triticum durum* et *T. monoccocum*, *Cannabis sativa*, *Dianthus caryophyllus*, *Oryza punctata* et *Pinus taeda*. Pour ces séquences les mêmes introns ont été retirés en N-terminal et en aval du second motif catalytique.

- Pour *Aquilegia coerulea*, *Citrullus lanatus* et *Ipomoea trifida*, un intron en N-terminal a été retiré.

- Des fragments de séquences ont été assemblés pour construire les séquences d'*Arabis alpina*, *Digitalis purpurea*, *Dioscorea villosa*, *Hevea brasiliensis*, *Picea sitchensis* et *Valeriana officinalis*.

- Pour *Arachis duranensis*, un fragment manquant en N-terminal a été ajouté à partir d'une autre séquence codante trouvée dans la même base de données.

- La séquence de *Pimpinella brachycarpa* a été mal épissée : un intron remplace la séquence consensus (F/Y)(I/V)Y(I/V)ENQYF(L/I)GX₄W (dont l'occurrence dépasse le seul cadre des PLD végétales). Cette erreur a donc été corrigée en remplaçant l'intron par la séquence manquante trouvée dans la même base de données.

- Certaines séquences contiennent des X en lieu et place de certains résidus. C'est le cas pour *Chenopodium quinoa*, *Gincko biloba*, *Nelumbo nucifera* et *Nicotiana tabacum*. Nous avons donc remplacé ces X par le résidu correspondant dans la séquence génomique.

- Enfin, les séquences d'*Oryza glumipatula* et *Quercus rubra* contiennent certes la bonne méthionine mais l'épissage fait commencer la séquence avec une méthionine située en amont. Dans ce cas-là le peptide qui ne s'aligne pas correctement avec le reste des séquences est retiré.

Les séquences qui n'ont pas pu être corrigées ou pour lesquelles des informations de séquences sont manquantes n'ont pas été utilisées.

Dans le cas où plusieurs séquences de PLD α sont trouvées dans un même organisme, nous avons choisi de ne garder que l'isoforme le plus proche en termes d'identité de séquence de notre modèle chez *A. thaliana*. Ainsi, nous ne gardons qu'un seul représentant par organisme, de façon à ne pas influencer la séquence consensus construite à partir de l'alignement.

Notons ici qu'au cours de nos recherches de PLD α végétales, une séquence extrêmement similaire à celle de PLD α de chou a été trouvée dans le génome de la chauve-souris *Rhinolophus sinicus* (Dong et al., 2017). Cette séquence, qui répond donc parfaitement aux critères établis ci-dessus n'existe pas de près ou de loin dans d'autres chauves-souris ni d'autres mammifères. Par ailleurs, la chauve-souris *Rhinolophus sinicus* présente des séquences de PLD typiques des mammifères. Nous pensons donc qu'il s'agit d'une contamination survenue lors du séquençage. Cette séquence n'existe pas chez un végétal que nous avons criblé ; or il semble clair qu'il s'agit d'une PLD α végétale et que nous sommes en présence d'une nouvelle séquence que la phylogénie place parmi les brassicaceae (Figure 22). Nous l'avons donc gardée dans notre sélection car elle apporte plus de diversité dans notre échantillon, même si son origine demeure inconnue.

Ainsi, ce criblage comporte des séquences de PLD α présentes chez différentes familles de végétaux comme les mousses, les hépatiques, les gymnospermes ou encore les angiospermes. Des fragments ont aussi été trouvés dans les fougères, témoignant ainsi de la remarquable conservation de la séquence de la PLD α au sein des organismes végétaux (Figure 22).

Les plus nombreux représentants de notre base de données sont les Poaceae (bleu clair) puis les Solenaceae (rouge), les Fabaceae (violet), les Brassicaceae (jaune) et les Orchidaceae (vert). Il n'est pas question ici de discriminer les organismes où la PLD serait présente de ceux dans lesquels elle ne le serait pas. À notre connaissance, une PLD α entière ou fragmentaire a été retrouvée dans tous les génomes complets séquencés de végétaux sans exceptions. En réalité nous avons criblé les bases de données à notre disposition, et force est de constater que celle-ci sont riches d'organismes à « visée agricole ». Notre criblage est donc influencé par le nombre de végétaux séquencés et nos critères établis pour sélectionner les séquences de PLD. À quelques exceptions près, les familles sont rassemblées entre elles au sein de l'arbre, démontrant la forte homologie de séquence entre les PLD. Les séquences les plus éloignées sont celles à gauche de l'arbre, à savoir Sphagnaceae, Funariaceae, Marchantiaceae,

Sellaginellaceae et Coccomyxaceae. Cette dernière est la plus éloignée de ses congénères mais partage tout de même 50 % d'identité de séquence protéique avec l'*AtPLD α* . Nous développerons son clonage et son expression recombinante au cours du chapitre 3. Enfin, dans certains cas nous ne possédons la séquence que d'un seul représentant d'une famille. C'est le cas pour les séquences les moins conservées citées ci-dessus. C'est aussi le cas pour les Papaveraceae, ou les Amaranthaceae.

Cette étude phylogénétique nous permet donc de présupposer l'occurrence du gène codant la PLD α dans tous les organismes végétaux.

L'alignement des 209 séquences nous permet de construire une séquence consensus de 924 caractères dont 808 sont effectivement des résidus d'acide aminé et 116 sont des trous de séquence. Sur 924 positions, 138 (15 %) sont strictement conservées dans les 209 séquences, 376 (41 %) sont conservées à plus de 95 % et 479 (52 %) sont conservés à plus de 90 %. Cet alignement nous permet donc de déterminer, grâce à la séquence consensus et à la représentation du « poids » de chaque résidu, les zones les plus conservées au sein des PLD α végétales.

La position relative des CR pour *conserved regions* ou régions conservées est décrite en Introduction en Figure 7.

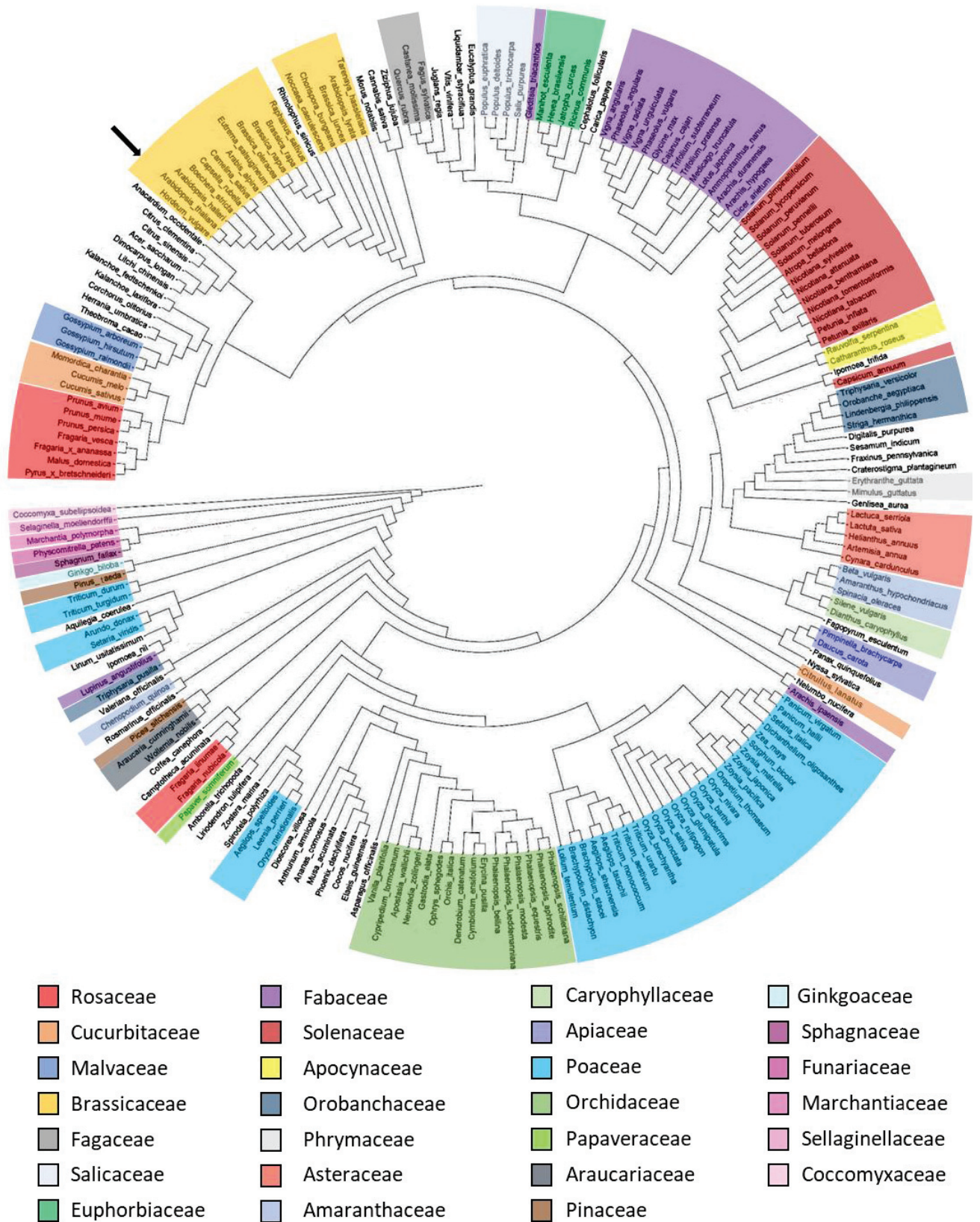


Figure 22 : Relation phylogénétique et diversité des PLD α végétales. La PLD α d'*A. thaliana* est indiquée par une flèche.

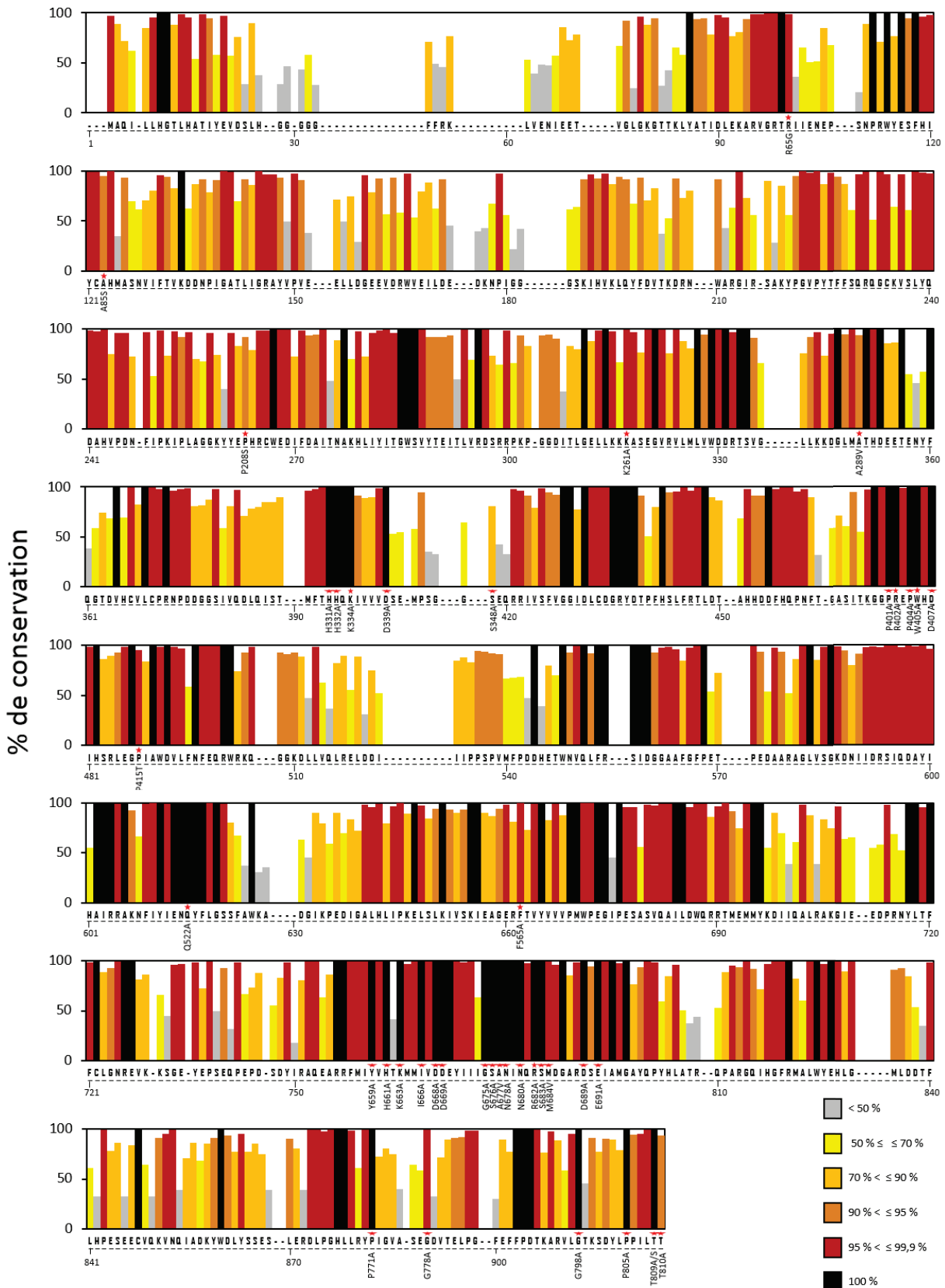


Figure 23 : Conservation des résidus au sein des PLD α végétales.

L'histogramme de la séquence consensus indique le score de conservation de chaque résidu dans l'alignement des 209 séquences de PLD α végétales. Les positions mutées dans l'*At*PLD α sont indiquées par des étoiles rouges et les résidus mutés dans la suite de ces travaux sont indiqués en dessous.

L'analyse se déroule du N-terminal au C-terminal.

On note en premier lieu un motif conservé LHGTLH directement en aval de la méthionine initiale (Figure 23).

À la suite de ce motif se trouve une zone très particulière puisqu'elle constitue la zone la moins conservée en termes de longueur, de quantité de trous et d'occurrences répétées de résidus particuliers dans toute la séquence consensus. Nous nous sommes beaucoup intéressés à cette zone car un site de clivage récurrent chez les PLD végétales s'y trouve. Nous aurons l'opportunité de se pencher plus longuement sur cette zone au cours de nos travaux décrits dans le chapitre 2 (cf. 3.2.2. Étude de la partie amino-terminale de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*).

Un cluster plus conservé autour de la position 90 laisse directement place à une courte zone peu conservée. Et ainsi de suite durant tout le domaine C2, des zones conservées font place à des zones qui le sont moins (position 20 à 210, Figure 23). Le domaine C2 domaine régulateur des PLD α qui fixe le Ca²⁺ est la zone la moins conservée dans toutes les séquences de notre crible.

Ce n'est qu'en C-terminal de ce domaine régulateur que le restant de la séquence est remarquablement bien conservé et peu de zones varient. Un premier motif "LIYITGWS" en position 280-287 constitue un cluster important dans l'identification des PLD végétales et des PLD de façon plus générale car c'est l'un des motifs typiques (CR Ia) décrits dans la littérature (cf. 1.3.3.1. Les PLD à motifs HKD et Figure 7). Directement en aval un motif très basique "LLKKK" est bien conservé en position 313-317 et correspond au CR IIa. En amont du motif HKD N-terminal se situe une séquence de type "GLMATHD" en position 347-353. Le premier site catalytique HKD "HHQKIVVVD" en position 395-203 (CR IIIa) est entouré de deux courtes zones peu conservées, mettant en lumière comme un îlot important l'état de conservation de ce motif HKD. La fin de ce motif n'est pas accolée comme dans les autres PLD du vivant. En effet, chez les végétaux il existe une insertion d'une dizaine de résidus mettant à distance du motif HKD le motif GG/GRY (position 427-428 et 434-436) normalement étroitement associé (CR IVa). On retrouve aussi des motifs décrits dans la littérature comme "PREPWHDIH" en position 474-482, un cluster de cinq résidus parfaitement conservés "FRSID" (position 563-570) et un motif conservé "HAIRRAKMFYIENQYFKG" (position 601-620) chez les PLD eucaryotes (CR Ib). On retrouve un autre motif basique "FTVYVVV" (CR IIb) (position 662-668) puis un second site HKD C-terminal de type "YVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMDGARDESEIAMG" (CR IIIb et IVb) (position 761-799) cette fois-ci plus long et plus conservé que le premier motif et enfin une séquence

consensus finale "PPILTT" (position 919-924) caractéristique de l'isoforme α des PLD végétales.

Les deux motifs HKD ne sont pas strictement équivalents dans leur longueur et leur composition au-delà du HXX₄D. On observe en réalité que, d'une part l'environnement du second motif catalytique est plus conservé que le premier là où en eux-mêmes les résidus catalytiques ont le même niveau de conservation, et d'autre part, que le second motif semble plus étendu que le premier comme nous le montrerons par la suite avec notre étude de mutagenèse dirigée.

3.1.1.2. Rationalité des mutants construits

Cette étude, unique dans la littérature, propose donc un criblage à l'alanine appelée aussi « *alanine screening* » sur les résidus les plus conservés dans les PLD α végétales en utilisant comme modèle l'*AtPLD α* recombinante (cf. 1.3.3.10. Modulation de l'activité PLD par mutagenèse dirigée).

Notons qu'une partie des résidus ciblés et conservés sont communs avec la PLD humaine, ce qui nous permettra, par le truchement de l'homologie, de transposer les constatations catalytiques aux PLD de mammifères.

Les résidus ciblés sont mutés par mutagenèse dirigée. La mutation est introduite au cours d'une PCR effectuée sur le plasmide d'expression pGAPZB avec des amorces contenant l'erreur à introduire dans l'ADN. La Figure 24A représente la position relative des résidus mutés dans la structure primaire de l'*AtPLD α* (Figure 24A). La Figure 24B représente la position de ces résidus dans un alignement de la PLD avec les PLD1 et 2 humaines, soulignant ainsi les résidus mutés en commun avec la PLD humaine (Figure 24B).

Dans un premier temps, nous avons ciblé les résidus des motifs catalytiques tels qu'ils sont décrits dans la littérature. Ceci permet en effet de valider notre système d'expression et notre capacité à produire et à détecter l'*AtPLD α* dont on sait que le type sauvage est actif (Rahier et al., 2016a) et que les mutants des résidus catalytiques doivent être inactifs (Lerchner et al., 2006). Ainsi les mutants du premier motif H332A, K334A et D339A et du second H661A, K663A et D668A sont réalisés (Figure 24).

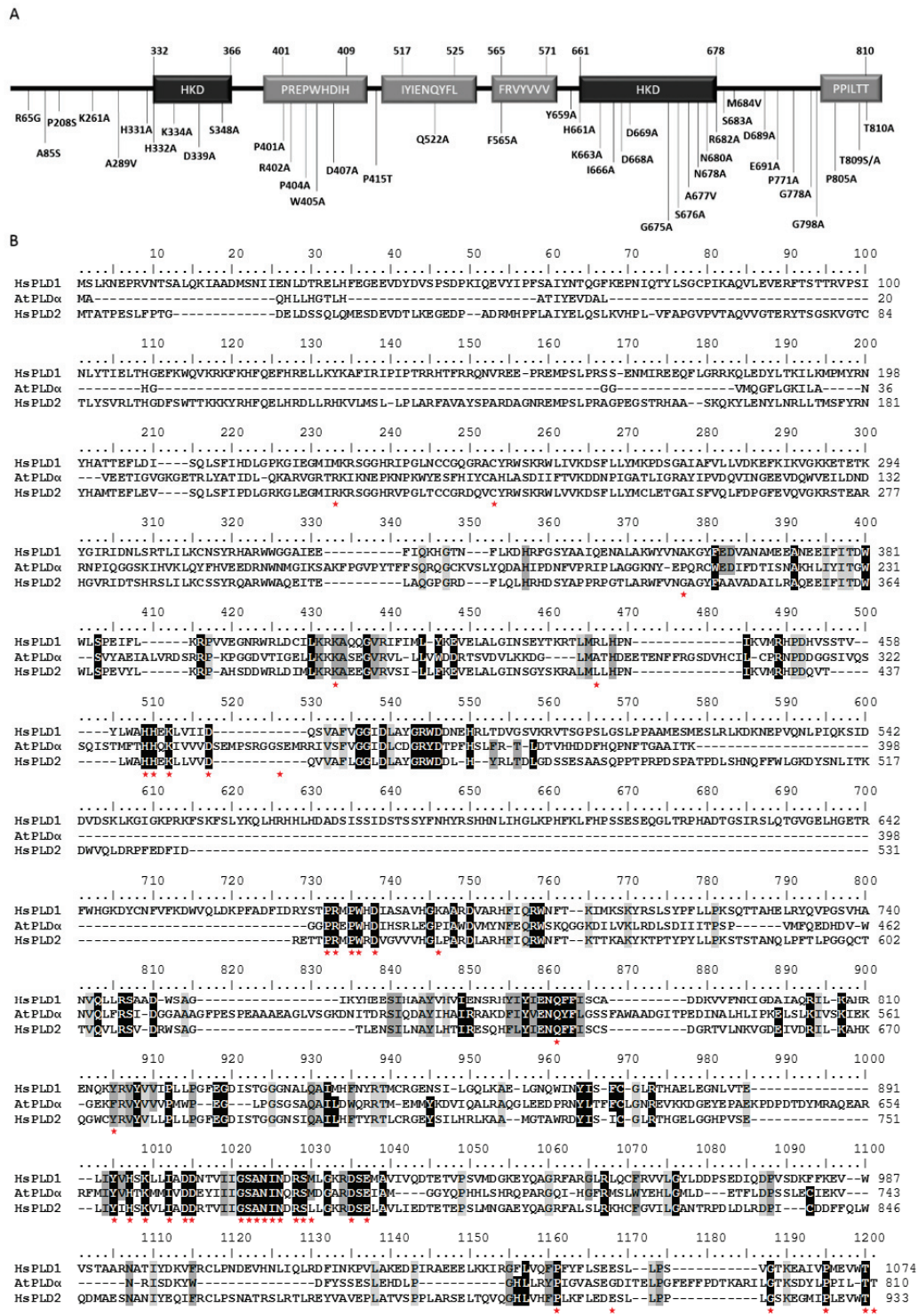


Figure 24 : Positionnement des mutations de l'AtPLDα.

A) Représentation schématique de la position des mutants dans la structure primaire de l'AtPLDα.
 B) Alignement de la PLD d'*A. thaliana* (AtPLD) avec les PLD1 et 2 humaines (HsPLD, *Homo sapiens*). À partir de la fin du domaine C2, les résidus alignés parmi les trois séquences sont en gris clair, les résidus similaires en gris foncés et alignés avec au moins deux des trois séquences sont en noir et la séquence consensus des PLD végétales sont conservés à au moins 95 %. Les résidus similaires en noir et alignés avec au moins deux des trois séquences et la séquence consensus des PLD végétales sont conservés à 100 %. Les résidus mutés dans l'AtPLDα sont indiqués par une étoile rouge.

Dans un second temps nous avons élargi le spectre de mutation puis muté les résidus à la fois conservés et à proximité de ces motifs catalytiques. Pour le premier motif, il existe un doublet d'histidyl dont le second H est décrit comme catalytique (H332). Nous vérifierons s'il existe une différence entre les deux résidus en mutant le résidu non décrit à présent (H331). Parallèlement au second motif, un résidu séryl est situé huit résidus après l'aspartyl (D) catalytique. Étant très conservé il est, lui aussi, muté et remplacé par un résidu alanyl (S348A). Dans le second motif, les résidus conservés sont plus nombreux ; nous avons muté le Y659A situé deux positions avant l'histidyl (H) catalytique. Entre les résidus K et D catalytiques nous avons muté l'I666 parfaitement conservé. Dans ce HKD C-terminal, il existe un doublet d'aspartyl dont seul le premier est décrit dans la littérature. Nous mutons donc le deuxième afin d'élucider son rôle plus précisément (D669A). On retrouve aussi le résidu séryl à huit positions du D catalytique S676A. Tout le motif en aval du HKD C-terminal est parfaitement conservé et il est muté ponctuellement dans son ensemble : G675A, S676A, A677V, N678A, N680A, R682A, S683A, M684V. Notons que pour muter l'A677 nous avons opté pour un résidu valyl structurellement proche de l'alanyl malgré un encombrement stérique et une hydrophobicité plus importantes. La mutation M684V est une mutation aléatoire obtenue au cours d'une PCR de mutagenèse dirigée.

Deux résidus supplémentaires sont mutés en aval de ce domaine HKD. En se basant sur les structures à hautes résolution de la PLD procaryote de *Streptomyces sp.* PMF les H catalytiques sont stabilisés par des résidus D (Leiros et al., 2004). On peut identifier ces résidus sur un alignement où le D202 de *Streptomyces sp.* stabilisant le H448 du motif HKD C-terminal se retrouve aligné avec le D407 chez *A. thaliana*. On décrit ci-dessous la mutation du D407 dans un domaine conservé (D407A). Le second aspartyl D473 de *Streptomyces sp.* stabilise le H170 du motif HKD N-terminal. Dans ce cas, son pendant chez *A. thaliana* n'est pas clair sur l'alignement. Cependant, en modélisant la structure de la PLD végétale par homologie avec la PLD bactérienne, deux résidus sont de bons candidats pour stabiliser l'histidyl catalytique ; il s'agit du D689 localisé à 3,9 Å du H332 et du E691 situé à 2,8 Å (Figure 25). Ces deux résidus sont mutés (D689A et E691A) car le D689 s'aligne mieux mais le E691 est plus proche et situé à la même distance de l'H332 catalytique que l'est le D407 du H661.

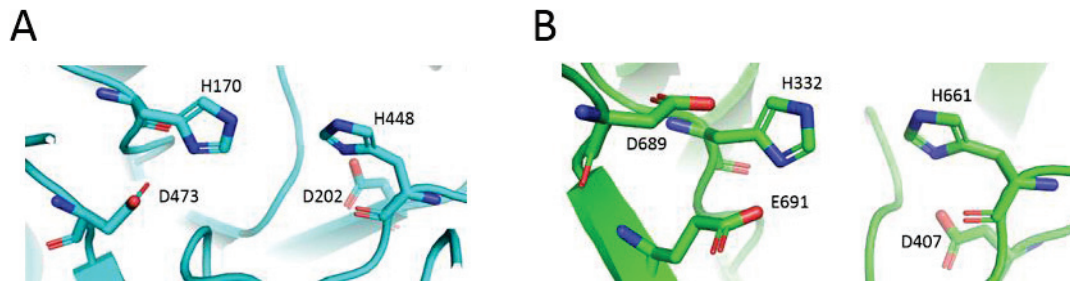


Figure 25 : Représentation structurale des D stabilisant le H catalytique.

A) Représentation du site catalytique de la PLD de *Streptomyces Sp. PMF* (PDB : 1v0s). B) Représentation du site catalytique de l'*AtPLDα* modélisé par homologie.

La description des mutants suivants s'effectue de la partie N-terminale à la partie C-terminale de la séquence consensus.

Nous avons ciblé des résidus appartenant à des motifs parfaitement conservés dans la séquence consensus et que l'on retrouve dans les PLD de mammifères. Dans un motif riche en lysyl "LLKKK" (position 313) chez les végétaux et "LLKRK" dans les PLD1 et 2 humaines nous avons muté le dernier résidu K261A.

Comme indiqué ci-dessus dans le motif "PREPWHDIH", identique et retrouvé dans les PLD humaines (Figure 24B), nous avons effectué les mutations des résidus parfaitement conservés P401A, R402A, P404A, W405A et D407A.

Dans le motif "FIYIENQYFKG" nous avons muté le résidu glutamyl Q522A.

En aval de ce motif se trouve un domaine hydrophobe riche en valyl "FTVYVVV" chez les végétaux, et respectivement "YRVYVVI" et "YRVYVLL" dans la PLD1 et PLD2 humaines. Afin d'étudier l'importance du résidu aromatique conservé dans ce domaine particulier (F chez les végétaux, Y chez l'Homme) nous l'avons muté également (F565A) (Figure 24).

En ciblant ces résidus nous pourrions extrapoler l'importance de ces domaines dans la PLD humaine. Dans le même esprit, trois autres résidus conservés entre la PLD humaine 1 et 2 et les PLD végétales mais ne faisant pas pour autant partie de domaines caractéristiques sont mutés : P771, G778, et G798.

Enfin, dans le motif terminal "PPILTT" nous avons effectué les mutations P805A, T809A, T809S et T810A. Pour ce motif et pour la mutation des deux derniers résidus, nous nous basons sur les données de la mutagenèse dirigée effectuée sur la PLD de chou (Lerchner et al., 2006). Lors de ces travaux les auteurs montrent que le mutant du résidu terminal T810A perd l'activité

enzymatique. À l'inverse, l'activité enzymatique est préservée lorsque le résidu tyrosyl est remplacé par un séryl (T810S) mettant en lumière l'importance du groupement hydroxyle dans la catalyse à cette position. Nous complétons cette étude en reproduisant ce même mutant T810A et focalisons le changement de résidu sur le résidu précédent tout aussi bien conservé (T809) en mutant à la fois en T809A et T809S.

Au cours des PCR de mutagenèse dirigée nous avons obtenus cinq mutations aléatoires en plus des mutations désirées:

- H661A + P208S
- Y659A + A289V
- H332A + A85S
- S348A + R65G
- A35L + P415T

Nous avons cherché à isoler ses mutations couplées pour pouvoir tester leur implication dans la catalyse enzymatique d'*AtPLD*. Les mutations P208S et A289V ont été isolées en utilisant l'enzyme de restriction MfeI dont un site existe dans le promoteur pGAP en 5' du gène et un autre dans *AtPLD α* en position 1394. Ainsi le fragment d'ADN digéré par MfeI de 1410 pb a pu être inséré dans le plasmide codant *AtPLD α* sauvage digéré avec la même enzyme de restriction et déphosphorylé.

Les mutations A85S (couplée à H332A) et R65G (couplée à S348A) ont été isolées en utilisant l'enzyme HindIII dont deux sites existent dans le gène codant *AtPLD α* en position 434 et 2206. Pour isoler A85S et H332A, le fragment libéré par l'enzyme HindIII (1772 pb) porte la mutation H332A, il est transposé dans le plasmide codant *AtPLD α* sauvage digéré avec la même enzyme de restriction et déphosphorylé. Le fragments *HindIII/HindIII* sauvage est transposé dans le plasmide contenant la mutation résiduelle A85S. Il en est de même pour isoler R65G et S348A. La mutation P415T est dans un plasmide contenant *AtPLD α* étiquetée en N-terminale avec six histidines. En utilisant l'enzyme XhoI dont un site existe avant l'ATG initiateur et un second site existe dans *AtPLD α* en position 727, on cherche d'abord à isoler la mutation A35L. Ainsi le fragment *XhoI/XhoI* de 763 pb portant la mutation A35L est transposé dans le plasmide codant l'*AtPLD α* -6xhis-Nt digéré par XhoI et déphosphorylé. La mutation P415T est isolée en transposant le fragment *XhoI/NotI* de 1708 pb dans un plasmide codant *AtPLD α* sauvage digéré par les mêmes enzymes de restriction.

La mutation M684V existait déjà à mon arrivée au laboratoire et a été obtenue au cours d'une

PCR sur le gène *AtPLD α* . M684, R65 et P415 sont des résidus conservés à plus de 95 %, A85, P208 et A289 sont conservés à plus de 90 %.

C'est donc une banque de 41 mutants que nous avons construite pour être exprimée et testée dans la levure *P. pastoris*. Parmi ces 41 mutants, 33 sont en commun avec la PLD1 et/ou la PLD2 humaine. Ainsi cette étude propose, par le biais de l'homologie de séquences entre les PLD végétales et humaines, d'étudier les résidus de la PLD humaine les plus conservés dans le vivant.

3.1.1.3. Activité catalytique des mutants

Le système d'expression *P. pastoris* ne maintient pas les plasmides libres mais les recombine au sein de son génome par recombinaison homologue au niveau du promoteur de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (pGAP) dans le cas du plasmide pGAPZB. Ainsi, chaque clone testé pour l'activité PLD est criblé par PCR au préalable pour vérifier l'insertion du transgène dans le génome de la levure.

Chaque mutant est ensuite testé dans les conditions décrites dans la partie Matériel & méthodes (cf. 2.2.4. Mesure de l'activité enzymatique). Un triplicat de clones indépendants est testé pour chaque construction et les résultats sont montrés dans la Figure 26. Le témoin positif est un clone de *P. pastoris* exprimant l'*AtPLD α* de type sauvage exprimé dans les mêmes conditions expérimentales et cultivé en parallèle des mutants testés. Le témoin négatif est un clone de *P. pastoris* transformé par le vecteur pGAPZB vide (sans insert).

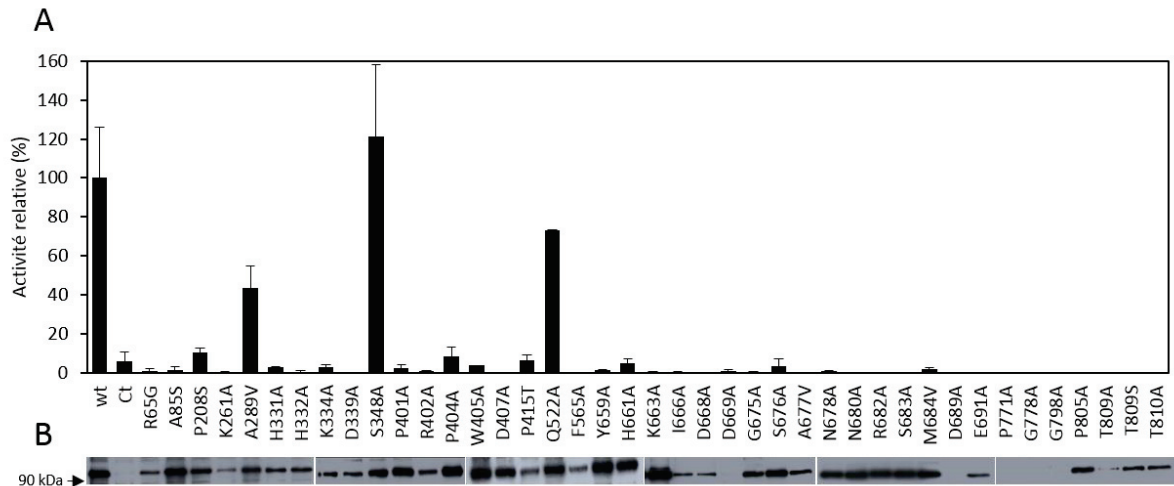


Figure 26 : Mesure de l'activité catalytique des mutants de l'AtPLD et de leur expression. A) L'activité spécifique relative est calculé avec 30 µg de protéines solubles extraites de *P. pastoris* exprimant ou bien la protéine sauvage (wt) dont la masse moléculaire est de 91,7 kDa, ou bien les mutants de l'enzyme ou transformée par le vecteur vide (Ct). L'activité relative est calculé par rapport au wt à 100 %. Toutes les activités enzymatiques sont testées sur trois clones indépendants ($p < 0.05$ pour toutes les constructions par rapport au wt, sauf pour les mutants S348A et Q522A). B) Analyse par immunoempreinte de l'expression des différents mutants (en dessous de chaque profil d'activité). Un clone sur les trois choisi de façon aléatoire est analysé par SDS-PAGE suivi d'une immunoempreinte avec un anticorps anti domaine C2 d'AtPLD α . La flèche indique la masse moléculaire de la protéine wt.

3.1.1.3.1. Mutations des résidus catalytiques "HXKX₄D"

Comme attendu et en accord avec les données de la littérature, les mutations des six résidus (2H, 2K, 2D) catalytiques abolissent complètement l'activité catalytique (Figure 26A) de l'enzyme, confirmant ici trois choses :

- Le système de criblage de l'activité catalytique à partir d'extrait brut de protéines solubles de *P. pastoris* utilisé dans ce travail est fiable et nous permet de discriminer la présence d'activité PLD (témoin positif, wt) ou son absence (vecteur vide, pGAP) (Figure 26A).
- Les résidus catalytiques mutés sont bien impliqués dans la catalyse.
- Les domaines HKD sont interdépendants et forment un seul site actif car la mutation d'un seul résidu des deux motifs abolit l'activité enzymatique (Figure 26A).

3.1.1.3.2. Motif "HHXKX₄DX₈S"

De façon plus inattendue, dans le motif HKD N-terminal, la mutation du doublet d'histidyl abolit l'activité enzymatique qu'il s'agisse de l'histidyl catalytique H332 décrite dans la littérature ou de l'histidyl qui le précède H331 (Figure 26A). À l'inverse, la mutation du résidu

séryl S348 situé en aval du motif HKD ne modifie pas l'activité catalytique (Figure 26A), signifiant qu'il n'est pas impliqué directement dans la catalyse.

3.1.1.3.3. Motif "YXHXKX₂IXDDX₆GSANXNX₂RSM"

La mutation des résidus situés autour du motif HKD C-terminal abolit elle aussi l'activité catalytique de l'enzyme (Figure 26A). C'est le cas pour le tyrosyl Y659 avant le motif HKD mais aussi pour l'isoleucyl I666 situé au milieu de ce motif. Dans le doublet d'aspartyl D668 et D669 dont l'un est décrit comme catalytique, la mutation du second abolit aussi l'activité. De même tous les résidus mutés en aval abolissent l'activité. Notons que le S676A ne présente pas d'activité alors que son pendant dans le motif HKD N-terminal (S348A) est actif. Il est difficile d'imaginer que ces 14 résidus soient tous impliqués dans la catalyse. D'ailleurs, les structures existantes des motifs HKD des PLD bactériennes indiquent des aspartyls D339 et D668 catalytiques relativement éloignés de la poche catalytique formée par la partie HXX des deux motifs (Leiros et al., 2000). Ceci semble indiquer qu'ils ne sont pas impliqués directement dans la catalyse ni dans la stabilisation des résidus catalytiques mais potentiellement dans la stabilité structurale de l'enzyme ou bien dans l'interaction de celle-ci avec ses partenaires ou son substrat.

3.1.1.3.4. Motif "LLKKK", "PREPWHDIH", "FIYIENQYFKG" et "FTVYVVV"

Sur le premier motif riche en lysyl, la mutation du K261A abolit l'activité et c'est aussi le cas pour tous les cinq mutants du motif "PREPWHDIH" (Figure 26A) : P401A, R402A, P404A, W405A et D407A. Notons ici que le mutant D407A dont on pense qu'il stabilise l'histidyl catalytique H661 ne possède pas d'activité. De la même façon, les mutations D689A et E691A dont on postule le même rôle n'ont pas d'activité.

Dans le motif "FIYIENQYFKG" la mutation du glutamyl central Q522 parfaitement conservée au cours de l'évolution (voir Figure 23) ne modifie pas ou très peu l'activité enzymatique (80 % de l'activité enzymatique du type sauvage). Inversement, la mutation du résidu aromatique F565 dans le domaine hydrophobe "FTVYVVV" abolit complètement l'activité enzymatique (Figure 26A).

Pour ce qui est des autres résidus en commun avec la PLD humaine (P771, G778, et G798), leur mutation abolit également l'activité enzymatique (Figure 26A).

3.1.1.3.5. Motif "PPILTT"

La partie C-terminale des PLD α végétales est particulièrement bien conservée. Ainsi les quatre mutations du domaine "PPILTT" abolissent l'activité catalytique de l'enzyme (Figure 26A). C'est le cas pour le P805A mais aussi, en accord avec la littérature, du threonyl terminal T810. Quant au threonyl T809, jusque-là jamais étudié son remplacement par un alanyl (T809A) ou bien un seryl (T809S) abolit l'activité catalytique dans les deux cas, démontrant ainsi son importance dans ce domaine pour l'activité de l'enzyme (Figure 26A). Lors de l'étude de la PLD de chou par mutagenèse dirigée en 2006 (Lerchner et al., 2006), les auteurs montraient l'importance du dernier résidu T en construisant plusieurs mutants, en ajoutant un résidu S ou encore en retirant ce dernier résidu T. Toutes ces modifications entraînaient alors l'abolition totale de l'activité enzymatique, suggérant que ce peptide terminal serait enfoui dans la structure de la PLD.

3.1.1.3.6. Mutations aléatoires

Des six mutations aléatoires que nous avons obtenues R65G, A85S, P208S, A289V, P415T et M684V, une seule conserve de l'activité. Le mutant A289V présente environ 50 % de l'activité du type sauvage (Figure 26A). Ce résidu, situé dans une zone conservée et typique des PLD végétales "GLMATHD", est retrouvé dans 93 % des séquences de PLD α végétales et est parfois substitué par un résidu valyl comme chez le romarin (*Rosmarinus officinalis*).

3.1.1.4. Expression des protéines mutées

Nous avons mesuré l'activité catalytique de chaque mutant et pour la majorité d'entre eux la mutation est fatale à l'activité enzymatique. Nous nous devons alors de vérifier si l'absence d'activité est due à une protéine non fonctionnelle mais structurellement stable et présente *in vivo*, ou à l'absence de protéine recombinante car celle-ci serait non exprimée ou dégradée. En effet, il est possible que la mutation que nous avons effectuée perturbe la structure de l'enzyme qui serait ainsi dégradée à la suite de sa synthèse. Il est aussi possible que la recombinaison du plasmide n'ait pas lieu au niveau du promoteur pGAP mais de façon accidentelle ailleurs au sein du génome, un phénomène commun chez *P. pastoris*. Auquel cas il est possible que cela limite la synthèse d'ARNm si la zone du génome est peu exprimée (Schwarzans et al., 2016). Nous testons donc par immunoempreinte la présence ou l'absence de la protéine mutée dans un

extrait cellulaire brut. Nous testerons ensuite la présence de l'ARNm dans les cellules pour les mutants dont la protéine est absente, afin de vérifier nos hypothèses exposées ci-dessus.

Dans chaque triplicat, un seul extrait brut de protéine soluble est testé par immunoempreinte avec un anticorps dirigé contre le domaine C2 de l'*AtPLD α* (cf. 2.2.6. Transfert des protéines sur membrane et révélation par immunoempreinte). Sur la Figure 26B on observe que la protéine sauvage est détectée autour de 90 kDa alors qu'avec les cellules contenant le plasmide vide on ne détecte aucune bande protéique de cette taille. Ainsi, qualitativement 88 % (36/41) des mutants testés sont exprimés.

Il existe cinq mutants (12 %) dont on ne détecte pas d'expression : D669A, D689A, P771A, G778A et G798A (Figure 26B). Le mutant D669A correspond au doublet d'aspartyl dans le motif HKD C-terminal dont le premier (D668) est décrit comme essentiel pour la catalyse. Le mutant D689A est un aspartyl dont on suppose qu'il interagit potentiellement pour stabiliser l'histidyl catalytique du motif HKD C-terminal (voir précédemment en 1.1.2).

Enfin, les trois derniers mutants sont localisés en fin de séquence P771A, G778A et G798A. Ces mutants sont parfaitement conservés chez les PLD végétales aussi bien que dans les PLD 1 et 2 humaines. Dans notre cas, on ne détecte pas d'activité PLD chez ces mutants (Figure 26B) et on ne détecte pas d'expression, bien que le transgène soit présent dans le génome. Deux hypothèses existent alors :

- La recombinaison ne s'est pas effectuée au bon endroit dans le génome ce qui modifie le niveau d'expression de l'ARNm et altère donc la synthèse de la protéine.
- La mutation altère la structure 3D de la protéine qui est dégradée et ainsi non détectable par immunoempreinte. Dans ce second cas l'ARNm devrait être détectable.

Avant de tester la présence de l'ARNm correspondant à la transcription du transgène, nous avons testé l'expression dans les deux autres clones du triplicat pour s'assurer que nous ne subissions pas l'influence du niveau d'expression variable entre les clones (Figure 27).

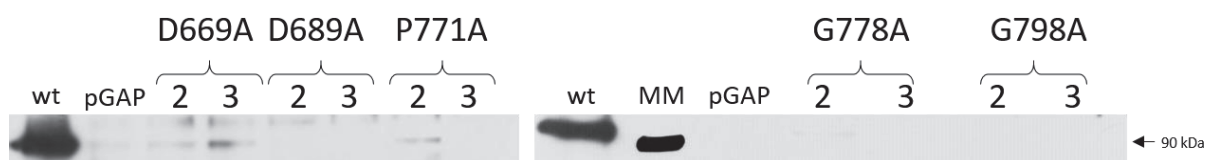


Figure 27 : Révélation par immunoempreinte après SDS-PAGE (10 %) des mutants de PLD des clones n°2 et 3 exprimés dans dans *P. pastoris*.

wt : extrait brut soluble de *P. pastoris* exprimant l'*AtPLD* de type sauvage. pGAP : extrait brut soluble de *P. pastoris* transformé par le vecteur vide. MM : marqueur de masse moléculaire.

Dans le cas des mutants D669A et P771A, on observe des bandes protéiques au niveau de la taille attendue (90 kDa) avec un très faible niveau d'expression comparé au type sauvage (Figure 27).

Pour tester la présence ou non de l'ARNm codant ces protéines, nous avons extrait les ARNm totaux des trois membres de chaque triplicat et amplifié par PCR quantitative (qPCR) un gène témoin *ARG4* et une portion du gène codant la *PLD* (cf. 1.3.6.3 2.1.3.6.3. qPCR).

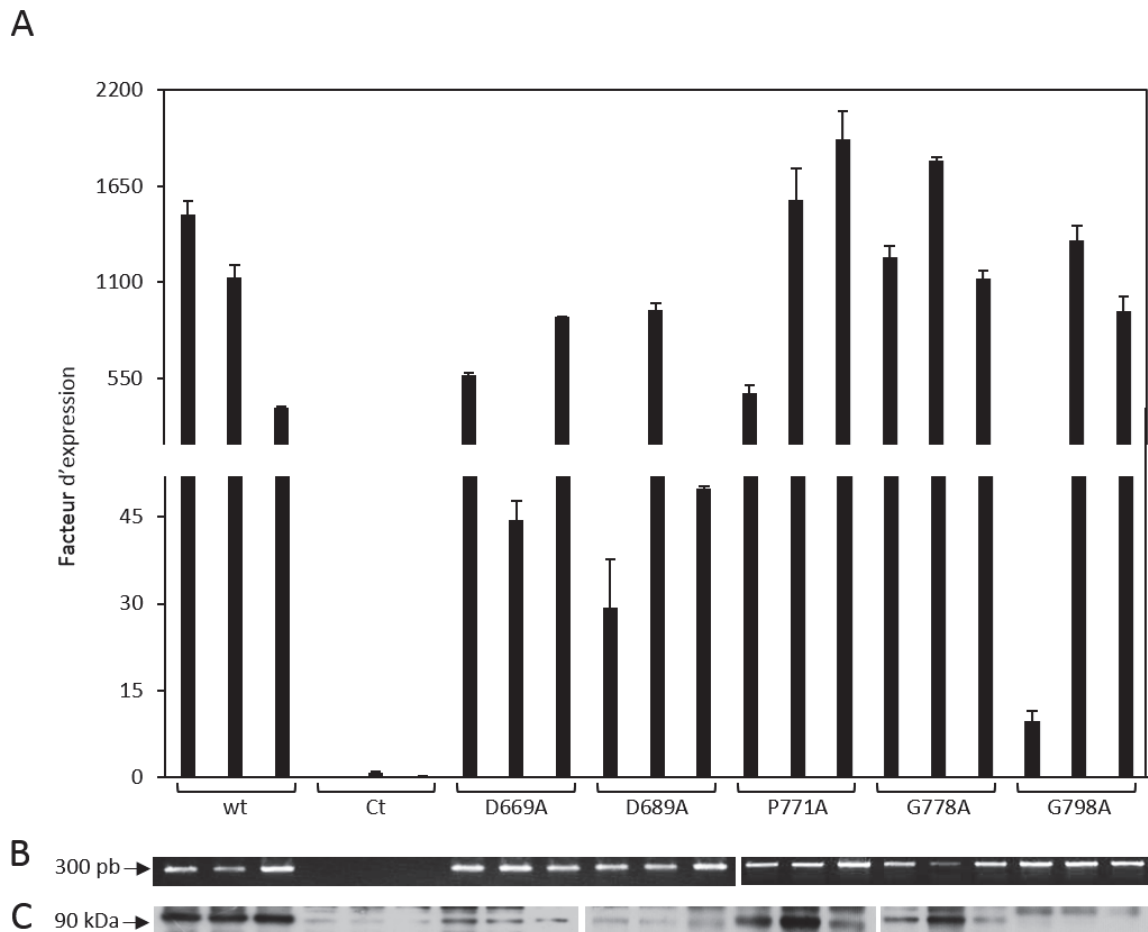


Figure 28 : Expression relative des ARNm codant la PLD dans les constructions où la protéine n'est pas détectée par immunoempreinte.

A) La quantité relative d'ARNm de trois clones indépendants exprimant la PLD sauvage (wt), le vecteur vide comme contrôle (Ct) et les mutants de la PLD est déterminée par RT-qPCR et calculé avec la méthode de quantification $2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'ARNm du gène *ARG4* est utilisé comme référence interne. Chaque mesure est réalisée deux fois. B) Vérification que le transgène est bien inséré dans le génome des clones recombinants. Après extraction de l'ADN, une PCR est effectuée avec l'amorce sens 29 située sur le promoteur pGAP et l'amorce antisens 102 située 300 pb en aval du promoteur. C) Révélation par immunoempreinte avec un anticorps anti domaine C2 après migration par SDS-PAGE (10 %) des extraits bruts des mêmes clones.

Tout d'abord, nous confirmons que le gène est présent au sein du génome par PCR avec des amorces situées sur le promoteur pGAP et une amorce interne située à 617 pb du codon *start*. À l'inverse, il n'y a aucune amplification par PCR sur le génome quand les cellules sont transformées par le vecteur vide pGAPZB (Ct) (Figure 28B). De même, nous détectons la présence des ARNm uniquement dans les cellules transformées par un vecteur contenant le gène *AtPLD* indiquant ici que l'insertion du transgène dans le génome ne nuit pas à la production de l'ARNm. Il semble donc que la protéine mutée produite soit mal repliée et donc dégradée (Figure 28A).

Les données de révélation par immunoempreinte sont plus difficiles à analyser puisque dans certains cas on observe bel et bien l'expression de la PLD mutée. Ce que l'on n'observait pas précédemment. Pour le mutant D669A l'expression protéique est de fait plus faible que le type sauvage (Figure 28C) pour des niveaux d'expression d'ARNm du même ordre de grandeur pour les clones 1 et 3 (Figure 28A). Pour le D689A le niveau d'expression protéique est encore plus faible et se trouve être du niveau du témoin négatif (cellules transformées par le vecteur vide) (Figure 28C). Dans ce cas-ci, seul le clone 2 possède un niveau de transcription du même ordre que le type sauvage (Figure 28A).

La protéine mutée P771A est clairement exprimée (Figure 28C) et on observe des niveaux d'expression d'ARNm de l'ordre du type sauvage pour les trois clones (Figure 28A).

La protéine mutée G778A a trois niveaux d'expression différents (Figure 28C) avec des niveaux d'ARNm de l'ordre du type sauvage (Figure 28A). Enfin la protéine mutée G798A n'est clairement pas exprimée (Figure 28C). Le clone 1 présente une expression très faible d'ARNm mais les clones 2 et 3 présentent un niveau comparable à celui du type sauvage (Figure 28A).

Ces résultats indiquent que :

- Les mutants sont correctement transformés dans la levure *P. pastoris* (Figure 28C) ;
- Les ARNm sont exprimés (Figure 28A) ;
- Cependant, on note un problème au niveau de l'accumulation de la protéine mutée recombinante (Figure 28B).

La première conclusion de ces résultats est que l'on ne peut pas corrélérer le niveau d'expression des ARNm avec la présence ou non de la protéine dans l'extrait brut soluble des cellules de *P. pastoris*. Ensuite, nous avons des niveaux d'expression et de transcription différents, mais des conclusions enzymatiques similaires puisqu'aucune activité PLD n'est détectée (Figure 26). On

est donc ici en présence de protéines mutées dont la mutation affecterait la stabilité, ce qui expliquerait notre difficulté à prouver leur présence par révélation par immunoempreinte.

3.1.1.5. Discussion

Le premier biais de cette expérience est le criblage effectué. En effet, nous avons ciblé des résidus parfaitement conservés au cours de l'évolution et certains sont conservés dans les PLD de mammifères, de végétaux et de bactérie comme le motif catalytique HKD. Il n'est donc pas étonnant de trouver beaucoup de résidus indispensables à l'activité. Nous sommes ici en présence d'une protéine remarquablement conservée au cours de l'évolution. Enfin, notons que la mutation de certains résidus modifie l'activité partiellement comme A289V unique aux PLD végétales. Dans ce cas-ci, la mutation augmente l'environnement hydrophobe sans pour autant porter atteinte drastiquement à l'activité catalytique. De même le Q522A dans lequel on ne retrouve pas l'activité au niveau du type sauvage est une modification à la fois de la charge et de l'encombrement stérique. Nos résultats montrent que, malgré sa remarquable conservation dans tout le vivant au sein de ce motif typique des PLD (Figure 9), sa mutation n'affecte pas l'activité catalytique de façon aussi importante que d'autres mutations. Ceci suggère que ce résidu possède un autre rôle comme l'interaction avec un partenaire ou avec le substrat. La mutation S348A, qui est dans une insertion présente uniquement chez les PLD végétales (Figure 24B), ne modifie quant à elle en rien la capacité catalytique de l'enzyme.

Les motifs catalytiques sont décrits et nommés tels que "HXKX₄D" depuis 1995 avec le clonage de la PLD humaine (Hammond et al., 1995). Compte tenu de nos résultats qui ciblent les résidus catalytiques et les résidus autour de ces motifs tout aussi bien conservés, nous choisissons de discuter l'étendue de ces motifs chez les végétaux. En effet pour le motif HKD N-terminal, nous montrons que la mutation H331A abolit l'activité, comme H332A qui correspond au H catalytique du motif HKD. Ainsi ce motif HXKX₄D peut se décrire désormais HHXKX₄D. Et ce d'autant plus que cette dyade de H existe chez les mammifères et les levures. Chez les bactéries cette dyade existe dans le motifs C-terminal sous la forme HHKX₄D.

Pour le motif HKD C-terminal, le criblage réalisé dans ce travail est plus étendu et la version que nous proposons du motif catalytique des PLD végétales est plus complet : le motif "HXKX₄DX₆GS/G" peut être reformulé comme "YXHXXKX₂IXDDX₅GSANXNX₂RSM". Cette version est valable aussi pour les PLD humaines, à l'exception du résidu M terminal qui est un résidu L dans la PLD2 (YXHXXKX₂IXDDX₅GSANXNX₂RSM/L). Dans ce motif il est

intéressant de noter la dyade de D dont le premier D est décrit comme catalytique. Leur mutation respective D668A et D669A ne produit pas le même effet. De fait, le D668A est inactif mais la protéine est facilement détectable par immunoempreinte alors que le D669A, tout aussi inactif, semble produire une protéine instable difficilement détectable. Notons que dans la littérature, une étude mute les deux aspartyls catalytiques D340E et D670E, les remplaçant par des résidus aux propriétés biochimiques proches (Lerchner et al., 2006). Cependant, si les auteurs montrent l'expression du D340E, ils ne montrent pas l'expression du D670E par immunoempreinte. Sung *et al.* (Sung, 1997), dans leur étude de mutagenèse dirigée sur la PLD humaine, ne montrent pas l'expression des mutants. Enfin, dans l'étude par mutagenèse dirigée de la PLD de *Yersinia pestis* par Rudolph *et al.* en 1999 (Rudolph et al., 1999), les auteurs indiquent que la mutation des D catalytiques des deux motifs HKD produit des protéines insolubles. La PLD de *Y. pestis* contient en effet deux fois le second motif "HXKX₄DX₆GS/G".

Il y a donc, compte tenu de nos résultats et des données de la littérature, un vrai point d'interrogation sur cette dyade d'aspartyl dont, rappelons-le, le rôle exact dans le mécanisme catalytique des PLD reste à déterminer. Ainsi, le fait d'étendre ces motifs ne justifie pas que tous ces résidus soient impliqués strictement dans la catalyse ; de fait dans le motif "HXKX₄D", l'aspartyl n'est clairement pas impliqué dans la poche catalytique de l'enzyme comme le montrent toutes les structures et tous les modèles que nous possédons. Ces motifs étendus indiquent l'importance de l'environnement des résidus catalytiques. On sait que les deux motifs HKD forment une seule et unique poche catalytique et on possède des hypothèses quant à la position des résidus environnants. Cependant, l'absence de structure 3D rend plus complexe encore la compréhension du motif catalytique des PLD chez les organismes eucaryotes.

Dans cette étude, nous avons caractérisé un nouveau motif jamais décrit chez les PLD. Le motif "PREPWHDIH" extensivement muté dans nos travaux semble essentiel dans son intégralité. De même, comme décrit dans la littérature, le peptide C-terminal "PPILTT" spécifique de l'isoforme α des PLD végétales est essentiel dans son intégralité. Ceci renforce l'hypothèse dominante de sa position enfouie au sein de la structure 3D de la protéine (Lerchner et al., 2006). Enfin, nombre de résidus dont les mutants sont apparus de façon aléatoire au cours de nos PCR de mutagenèses dirigées affectent l'activité catalytique de l'enzyme. Ici encore, en l'absence de structure 3D, cette étude complexifie le mécanisme catalytique des PLD.

3.1.1.6. Conclusions & perspectives

La mutagenèse dirigée est une méthode qui nous permet de muter de façon ponctuelle des résidus en les remplaçant par un résidu de notre choix. C'est ainsi, une façon de déterminer le rôle de ce résidu selon son importance dans la fonction catalytique ou la structure de l'enzyme. Ici, nous proposons un criblage à l'alanine qui nous permet de tester l'importance des chaînes latérales, l'effet de perte de charge et de modification de l'encombrement stérique car l'alanyl est un résidu neutre non encombrant qui n'introduit pas de flexibilité dans la chaîne de carbone α .

Nous ciblons les résidus les plus conservés chez les PLD végétales déterminés grâce à l'alignement de 209 séquences de PLD végétales représentatives de la majeure partie des familles de ce règne. Nous portons une attention particulière pour ceux qui existent aussi dans la PLD humaine. Pour rappel, la PLD humaine est une véritable cible thérapeutique et la caractérisation des zones importantes pour la catalyse et la structure de cette enzyme va aider à la compréhension de son mécanisme d'action ainsi que la régulation de son activité catalytique, notamment par des inhibiteurs spécifiques. Un axe de recherche que nous explorerons au cours du chapitre 2 de ces résultats.

La très grande majorité des mutations que nous avons créées (93 %, 38/41) abolissent l'activité catalytique sans pour autant affecter la stabilité de l'enzyme. De ces mutants on peut donc conclure que le résidu ciblé participe ou bien à la catalyse ou bien à l'interaction avec le substrat ou bien encore à l'interaction avec le cofacteur, ici les ions Ca^{2+} . Parmi ceux-ci, 80 % existent aussi dans la PLD humaine et 5 mutants (12 %, 5/41) sont inactifs et semblent avoir des difficultés à accumuler une protéine stable, ce qui pourrait signifier qu'ils altèrent d'une façon ou d'une autre la structure 3D de la protéine, entraînant de ce fait sa dégradation.

Notre système d'expression ne nous permet pas d'exprimer la protéine recombinante en quantité suffisante pour pouvoir purifier les mutants. Par ailleurs, la méthode de purification des PLD végétales possède un rendement trop faible pour envisager, dans notre étude, la purification de tous les mutants de la banque. Le développement de nouvelles méthodes spécifiques de purification des mutants par chromatographie d'immunoaffinité par exemple serait nécessaire, ce qui nous permettrait d'envisager de futures expériences quant à l'interaction de l'enzyme avec son substrat (technique des films monomoléculaires par exemple) selon les mutations effectuées. Nous pourrions aussi observer l'état du repliement des

protéines mutées par dichroïsme circulaire et ainsi déterminer les mutations qui déstabilisent la structure.

La collection de mutants créée aux cours de ces travaux est transposable à d'autres PLD végétales. De fait, la remarquable conservation de séquence entre toutes les PLD végétales permet de transposer nos résultats à l'ensemble de ces enzymes chez les bactéries comme chez les mammifères.

3.1.2. Analyse structurale de la PLD de *Vigna unguiculata*

3.1.2.1. Intérêt d'une structure 3D

Comme indiqué précédemment, il serait des plus intéressants de connaître la topologie des résidus catalytiques de la PLD chez les eucaryotes dont notre étude de mutagenèse démontre l'étendue des résidus impliqués de près ou de loin dans la catalyse. Or, une telle structure est manquante dans la littérature. Par ailleurs, une structure 3D est un outil de travail conséquent pour cribler *in silico* des inhibiteurs, cibler plus précisément des zones d'étude et ainsi déterminer quelles sont les zones d'interactions. Comme nous le montrerons par la suite, l'un des enjeux chez les PLD eucaryotes est de localiser, par rapport au repliement du cœur catalytique, les domaines régulateurs (domaine C2 pour les PLD végétales et domaines PX/PH pour les PLD de mammifères).

Au cours de cette étude nous utilisons la PLD de *V. unguiculata* (*VuPLD*) exprimée dans la levure *P. pastoris*. L'expression de cette enzyme est particulière car l'activité catalytique d'un extrait brut est très importante. Par comparaison, un extrait brut de cette souche contient 10 000 fois plus d'activité totale qu'un transformant avec l'*AtPLD α* (Figure 29).

Nous sommes probablement en possession d'un clone « jackpot » dans lequel de multiples recombinaisons de plasmides ont eu lieu, ou bien la recombinaison a eu lieu dans une zone du génome particulièrement bien exprimée. De fait, comme nous le précisons auparavant (cf. 3.1.1.4. Expression des protéines mutées) nous ne contrôlons pas le nombre d'insertions ni le site d'insertion du transgène dans le génome, et ce nombre et cette position peuvent influencer le niveau d'expression et donc d'activité enzymatique (Schwarzans et al., 2016). Il est intéressant de noter que certaines équipes utilisent ce biais pour favoriser l'expression d'une protéine recombinante dans *P. pastoris*. Elles construisent un plasmide avec plusieurs copies

du gène les unes à la suite des autres pour augmenter le niveau d'expression de la protéine recombinante (Li et al., 2016).

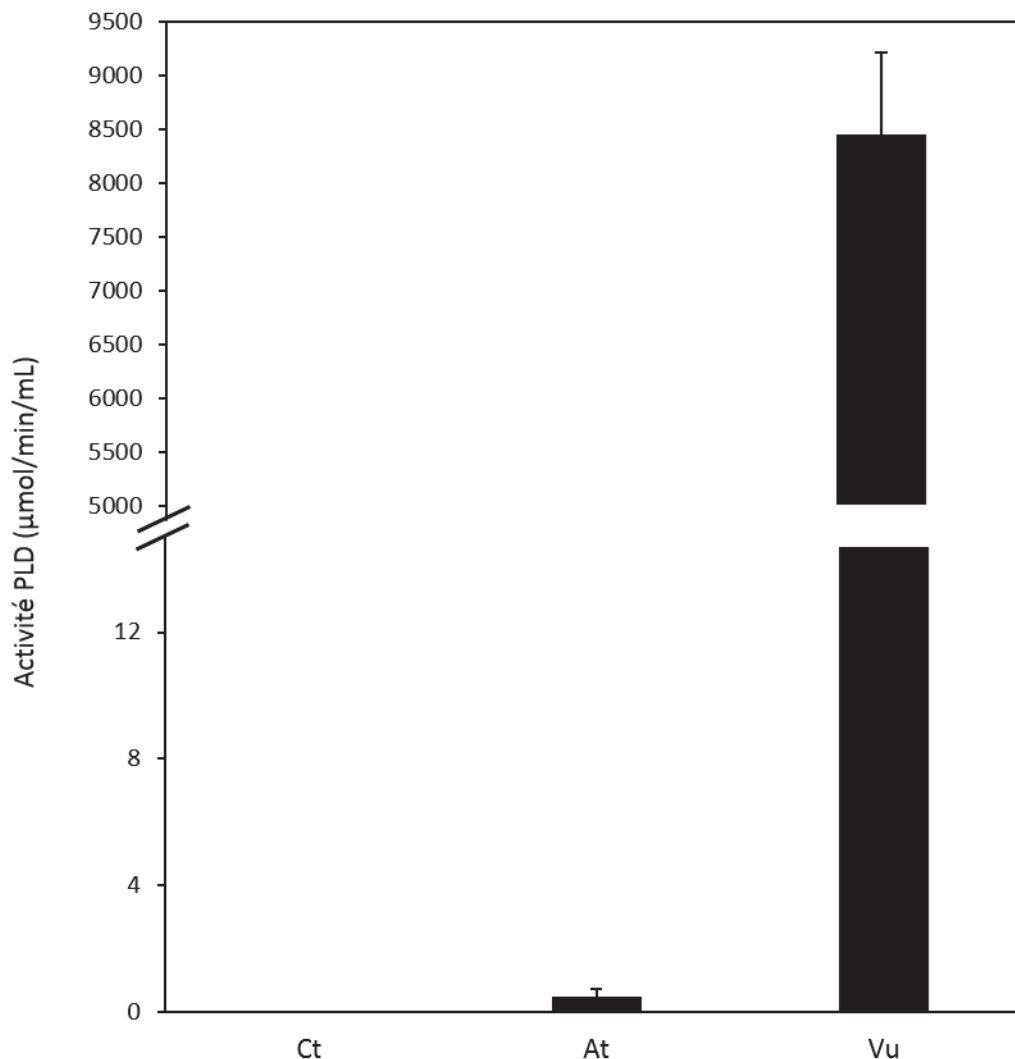


Figure 29 : Comparaison de l'activité totale d'un extrait brut de *P. pastoris* exprimant *AtPLD* et *VuPLD*.

3.1.2.2. Étude structurale expérimentale de la PLD

La résolution structurale d'une protéine est un enjeu important pour comprendre l'organisation spatiale des atomes de chaque acide aminé dans un espace 3D. Dans ce domaine, le dogme scientifique actuel relie la fonction des protéines à leur structure. Si ce dogme est de plus en plus discuté avec l'avènement des protéines intrinsèquement non structurées (cf. 1.3.3.6.1. La relation structure-fonction) la connaissance de la structure des protéines apporte aussi des informations sur leur fonction.

La cristallographie, qui consiste à cristalliser une protéine pour ensuite faire diffracter le cristal aux rayons X, est une méthode utilisée depuis le milieu du 20^{ème} siècle afin de déterminer la

structure à l'échelle atomique des macromolécules biologiques. À ce jour, il s'agit de la méthode la plus résolutive pour déterminer la structure des protéines de taille intermédiaire comme la PLD.

Les méthodes de biologie structurales comme la cristallographie nécessitent plusieurs milligrammes de protéines à une concentration de l'ordre de 10 mg/mL afin :

- d'étudier la protéine à une concentration élevée ce qui permet d'assurer de bonnes conditions de croissance cristalline ;
- de cribler un grand nombre de condition pour optimiser la qualité des cristaux.

Par ailleurs, une grande pureté de l'échantillon est nécessaire pour permettre la cristallisation de la protéine.

3.1.2.2.1. Purification de la *Vu*PLD

La purification de la *Vu*PLD exprimée dans la levure *P. pastoris* est décrite dans la partie Matériel & méthodes (cf. 2.2.3. Purification de protéines). Cette méthode de purification spécifique aux PLD végétales décrite en 1992 (Lambrecht and Ulbrich-Hofmann, 1992) couple les phénomènes de chromatographie hydrophobe et d'affinité. En effet, on se sert de l'Octyl Sépharose[®] comme d'une interface hydrophobe sur laquelle se fixent les PLD en présence de Ca²⁺. Cette fixation est résorbée par ajout d'EDTA qui, en chélatant les ions calcium, permet l'élution spécifique de la PLD (Figure 30). Cette méthode possède un avantage certain car elle ne présuppose pas de modification de l'enzyme comme l'ajout d'une étiquette ou d'une séquence spécifique pour la purification. Nous montrons au cours de ces travaux de thèse que la PLD végétale est très sensible aux mutations et aux modifications de séquences (cf. 3.1.1. Mutagenèse dirigée de la PLD d'*Arabidopsis thaliana* et 3.2.2. Étude de la partie amino-terminale de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*), notamment pour la stabilité de son activité enzymatique. Avec cette méthode qui permet de purifier une enzyme native, nous pouvons suivre l'avancée de la purification par l'activité catalytique.

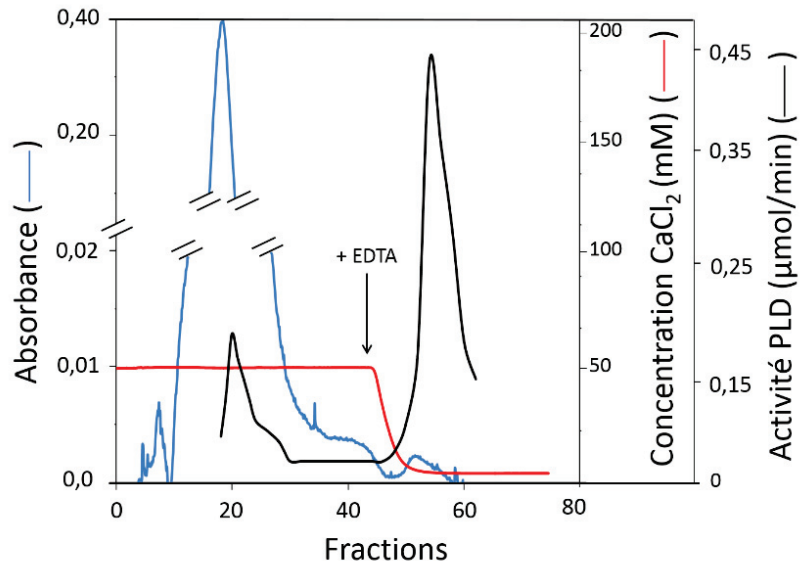


Figure 30 : Chromatogramme de purification de la *Vu*PLD sur Octyl Sépharose®.

L'absorbance UV à 280 nm est la courbe en bleu, la conductivité due au calcium est en rouge et le suivi de l'activité catalytique en $\mu\text{mol}/\text{min}$ est en noir. L'ajout d'EDTA entraîne la chélation du calcium et l'éluion de *Vu*PLD.

Sur les 50 purifications (Tableau 5) effectuées durant cette thèse, nous purifions en moyenne 0,44 mg de protéine par 500 mL de culture avec un rendement moyen de 25 %.

Tableau 5 : Purifications de VuPLD

Les cellules grisées indiquent des données expérimentales incomplètes. mg : quantité de protéine purifiée en mg. Rdt : rendement.

Purification	mg	Rdt	Utilisation	Purification	mg	Rdt	Utilisation
1				29			
2	0,57	87 %	SEC/MALS	30	0,16	14 %	Criblage 4/5/SAXS
3	0,39	38 %	SEC/MALS	30	0,35	21 %	Criblage 4/5/SAXS
4	0,5	2 %	SEC/MALS	31	0,13	42 %	Criblage d’Inhib.
5				31	0,08	7 %	Criblage 4/5/SAXS
6	1,43	7 %	SEC/MALS	32	0,47	8 %	Criblage 4/5/SAXS
7	0,47	20 %	Criblage 1	33	0,4	10 %	Criblage 4/5/SAXS
8	0,37	12 %	Criblage 1	34	0,58	24 %	Criblage 4/5/SAXS
9	0,43	6 %	Criblage 1	35	0,66	26 %	Criblage 4/5/SAXS
10	0,32	4 %	Criblage 1	36	0,9	94 %	Criblage 4/5/SAXS
11	0,33		Criblage 1	37	0,4		Criblage 4/5/SAXS
12	0,18	4 %	Criblage 2	38	0,27	3 %	Criblage 4/5/SAXS
13	0,03	10 %	Criblage 2	39	0,33		Criblage 4/5/SAXS
14	0,11	10 %	Criblage 2	40	1,47		Criblage 4/5/SAXS
15	0,025	75 %	Criblage 2	41			
16	0,5	9 %	Criblage 2	42	1,46		Criblage 4/5/SAXS
17	0,25	10 %	Criblage 2	43	0,65		Criblage 4/5/SAXS
18	0,47	8 %	Criblage 2	44	0,855		Criblage 4/5/SAXS
19	0,18	7 %	Criblage 2	45	0,87		Criblage 4/5/SAXS
20	0,42	88 %	Criblage 3	46	1,3		
21	0,13	5 %	Criblage 3	47			
22	0,2	45 %	Criblage 3	48			
23	0,09	56 %	Criblage 3	49			
24	0,05	21 %	Criblage 3	50	0,33		
25	0,1	22 %	Criblage 3	50	0,63		
26	0,19	26 %	Criblage 3				
27	0,29	51 %	Criblage 3				
28	0,19	16 %	Criblage 3				

Les purifications 29 et 41 n'ont pu être menées à terme pour des raisons techniques ; les purifications 1 et 5 n'ont pas permis d'obtenir de protéines dans l'élution. Les purifications 30, 31 et 50 ont montré deux pics d'élutions séparés. Ce point sera discuté dans le chapitre 2 (cf. 3.2.2.1. État de l'art). Les purifications 2 à 6 ont été assemblées pour effectuer des expériences de SEC/MALS. Les purifications 7 à 11 ont été assemblées pour effectuer le premier criblage des conditions de cristallo-genèse. Les purifications 12 à 19 ont été assemblées pour le second criblage autour des conditions fructueuses précédemment obtenues. Les purifications 20 à 28 ont été assemblées pour le troisième criblage. Les purifications 30 à 45 ont été assemblées pour le quatrième criblage, puis le cinquième criblage et les études de SAXS. Parmi celles-ci, le pic le plus abondant de la purification 31 a été utilisé pour le criblage d'inhibiteurs de la PLD qui sera développé au cours du chapitre 2 (cf. 3.2.3. Criblage, identification et caractérisation d'un nouvel inhibiteur des PLDs). L'enzyme utilisée pour les étapes suivantes est dans un tampon Pipes 10 mM pH 6,2, EDTA 0,1 mM, NaCl 50 mM.

La suite de ces travaux a été réalisée en collaboration avec Laurent Terradot et Mickaël V. Cherrier au sein de l'équipe Biologie structurale des complexes macromoléculaires bactériens de l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines de Lyon (IBCP) puis en collaboration avec Mickaël V. Cherrier au sein de l'équipe Métallo-protéines de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (IBS)

3.1.2.2.2. SEC/MALS

Cette méthode nous permet de donner une idée de la conformation quaternaire de la protéine en solution, et de connaître sa masse absolue et l'homogénéité en solution (cf. 2.3.1. SEC/MALS) qui est un paramètre majeur en vue d'une cristallisation.

Nous analysons ici la protéine après deux étapes de purifications : une étape de chromatographie sur Octyl Sépharose[®] et une étape de chromatographie d'exclusion.

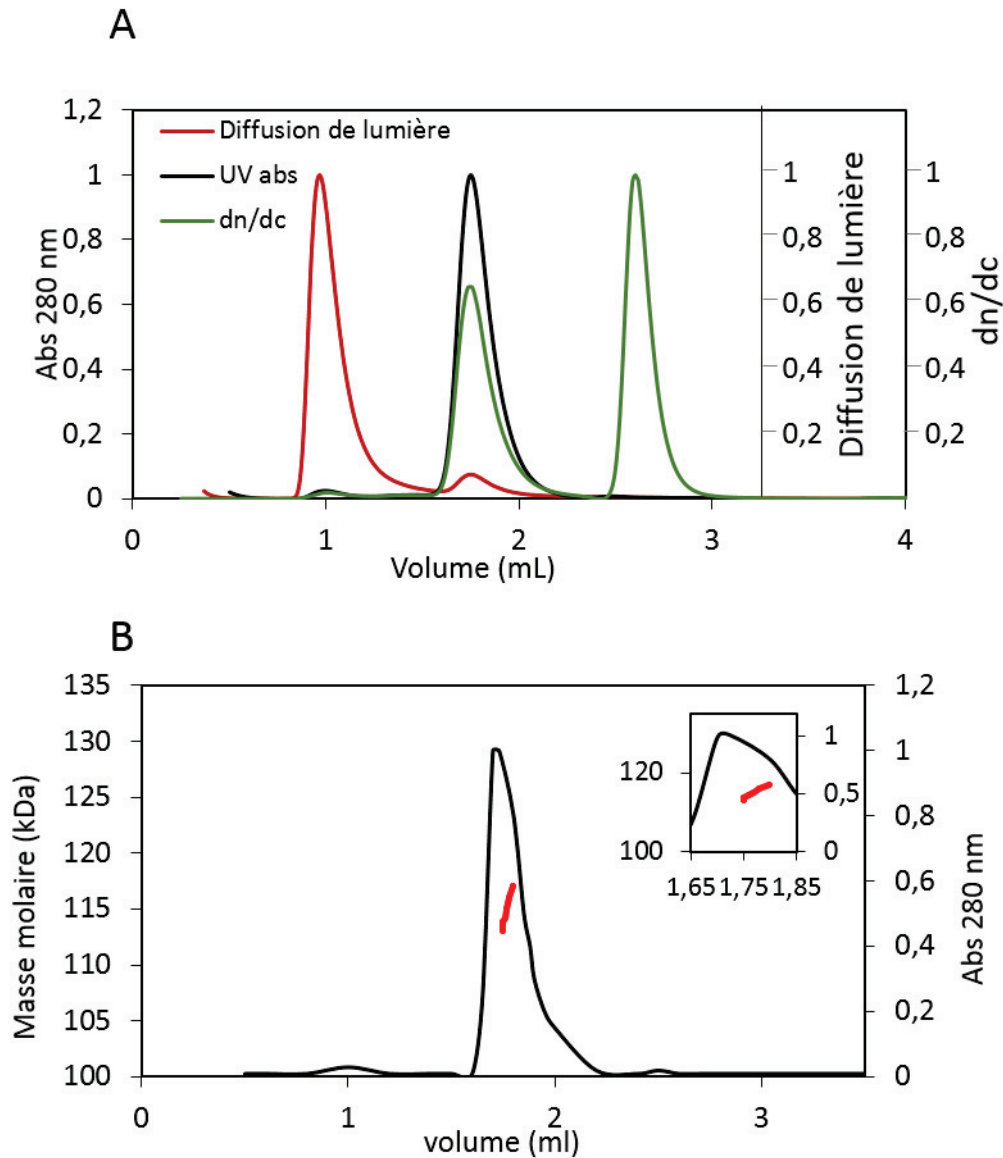


Figure 31: Profil SEC/MALS de la VuPLD

A) Courbes non traitées, en rouge les mesure de la diffusion de lumière, en vert le rapport dn/dc et en noir l'absorbance UV à 280 nm. B) Chromatogramme de purification et analyse de la masse moléculaire en fonction du volume. Les points rouges représentent la répartition des masses calculées. La courbe noire représente l'évolution de l'absorbance à 280 nm.

Tout d'abord nous observons une importante diffusion de lumière en sortie de colonne pour un faible pic UV et un faible rapport dn/dc (Figure 31A). Le second pic de la Figure 31A est important en UV et en rapport dn/dc indiquant qu'il s'agit bien d'un pic de protéine. Le troisième pic est faible en UV et en diffusion de lumière ; à ce stade l'échantillon est très peu concentré ce qui explique le rapport important dn/dc .

Après traitement (Figure 31B), il apparaît que le pic initial à 1 mL est un agrégat d'origine inconnue dont la taille plus importante en solution diffuse beaucoup de lumière mais

l'absorption UV à 280 nm indique qu'il ne s'agit pas de protéines. On observe un pic minime à 1,4 mL puis un pic majeur à 1,7 mL qui correspond à V_u PLD. Un dernier pic minime apparaît à 2,5 mL mais l'importance du pic dn/dc (Figure 31A) témoigne de la faible quantité de protéines.

Au cours de cette expérience la masse moléculaire mesurée de V_u PLD est de 115 kDa. Cette masse est plus importante que la masse théorique de 91,5 kDa. Plusieurs facteurs expliquent cela. Tout d'abord, même après une chromatographie d'exclusion des contaminants demeurent et peuvent influencer la lecture de la masse moléculaire de la protéine en solution. De fait, selon la qualité de la chromatographie, des contaminants de masse moléculaire proche de celle de la PLD pourront ne pas être exclus. Ensuite, on sait que les PLD végétales subissent des modifications post-traductionnelles, des glycosylations pouvant affecter la masse théorique de l'enzyme (Ben Ali et al., 2007). Enfin, le SEC/MALS est calibré au préalable avec de la BSA qui est une protéine globulaire. Cela peut introduire un biais si d'aventure la PLD possède une structure et des proportions radicalement différentes.

L'une des informations majeures que nous apporte cette expérience de SEC/MALS est la présence d'un pic unique de V_u PLD témoignant d'une part de son homogénéité en solution et d'autre part de sa propension à rester monomérique et à ne pas dimériser en solution concentrée.

Ce facteur est particulièrement important pour mener à bien un criblage de cristallogénèse dans lequel la protéine doit être concentrée et homogène en solution.

3.1.2.2.3. Criblage de conditions de cristallogénèse

Afin d'homogénéiser la solution et d'exclure les contaminants, chaque essai de cristallogénèse est précédé d'une chromatographie par filtration sur gel. Cette chromatographie d'exclusion est plus précise que pour le SEC/MALS car on utilise une colonne plus résolutive (*Superdex S200 Increase*). On observe ainsi un premier pic en début de chromatogramme avec des absorbances à 254 et 280 nm équivalentes. Ce pic est typique d'un agrégat de protéines et d'acides nucléiques non retenues sur la colonne. Un second pic plus faible apparaît dans les fractions 15 à 18, l'absorbance indique qu'il s'agit de protéines. Enfin, un pic majeur à partir de la fraction 20 avec une absorbance à 280 nm plus importante indique l'élution de la PLD (Figure 32A).

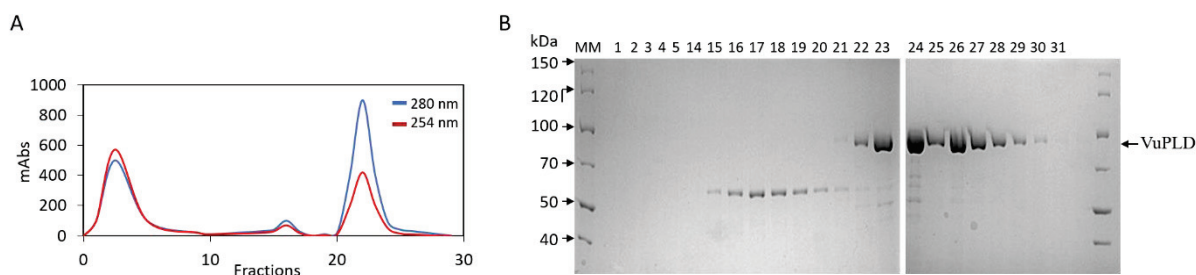


Figure 32 : Chromatographie par filtration sur gel.

A) Chromatographie sur Superdex S200 Increase avec lecture UV à 280 nm (protéine) et 254 nm (acides nucléiques). B) Analyse par SDS-PAGE (10 %) des fractions d'éluion 1 à 5 puis 14 à 31. MM : marqueur de masse moléculaire.

L'analyse de ces fractions par SDS-PAGE indique que le pic majeur contient bien la PLD à 90 kDa. Le pic minoritaire situé en amont (fractions 15 à 19) contient une protéine à 60 kDa en condition dénaturante. Puisqu'elle est exclue avant la PLD, cela suggère qu'il s'agit d'une protéine dimérique à 120 kDa en condition native. Celle-ci constitue alors le principal contaminant de la purification sur Octyl Sépharose®. Enfin, l'aggrégat initial ne contient pas de protéines détectables sur ce type de séparation. Celles-ci sont peut-être trop importantes en masse ou bien il s'agit d'acides nucléiques (Figure 32B).

Au cours de cette étape nous parvenons donc à exclure le contaminant à 60 kDa en conditions dénaturante. C'est avec la réunion des fractions 22 à 30 de la Figure 32B que nous allons cribler des conditions de cristallo-genèse.

3.1.2.2.3.1. Premier criblage

Lors du premier criblage nous avons testé des conditions de cristallisation identiques et proches de celles pour lesquelles de précédents chercheurs avaient obtenu des cristaux de la *VuPLD* recombinante (Abergel et al., 2001). La protéine est concentrée à 7 mg/mL, nous utilisons la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue sur une plaque 24 puits où les gouttes sont effectuées à la main. Au cours de cette méthode, les interactions solvant-protéines sont remplacées progressivement par des interactions protéines-protéines. Un équilibre s'établit progressivement entre la solution de cristallisation en excès dans un réservoir et une goutte contenant la protéine concentrée. La diffusion de la vapeur d'eau, de la goutte vers le réservoir, permet une concentration lente de la protéine ; ceci conduit soit à la formation de cristaux à partir de la zone de nucléation soit à la précipitation.

Boîte 1 : Imidazole 0,1 M pH 8,5		Concentration croissante en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ →					
		1	2	3	4	5	6
A	NaCl	0 M	0 M	0 M	0 M	0 M	0 M
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 M	1,5 M	1,6 M	1,7 M	1,8 M	1,9 M
B	NaCl	0,25 M	0,25 M	0,25 M	0,25 M	0,25 M	0,25 M
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 M	1,5 M	1,6 M	1,7 M	1,8 M	1,9 M
C	NaCl	0,50 M	0,50 M	0,50 M	0,50 M	0,50 M	0,50 M
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 M	1,5 M	1,6 M	1,7 M	1,8 M	1,9 M
D	NaCl	0,75 M	0,75 M	0,75 M	0,75 M	0,75 M	0,75 M
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 M	1,5 M	1,6 M	1,7 M	1,8 M	1,9 M

Concentration croissante en NaCl ↓

Figure 33 : Criblage de conditions de cristallogenèses, boîte 1.

Les concentrations des solutions sont indiquées dans chaque puits. La protéine à 7 mg/mL (1 μL) est mélangée à 1 μl de la solution du puits. Chaque puits contient 500 μl de la solution de cristallogenèse. Les puits grisés sont les conditions pour lesquelles des cristaux ont été obtenus (Abergel et al., 2001). Le puits surligné en rouge correspond à une condition où des cristaux sont obtenus.

En plus de cette plaque (Figure 33) une plaque à 96 puits a été remplie au robot Mosquito avec 100 nL de protéine à 7 mg/mL et 100 nL de solution de cristallogenèse. Les kits "Hampton Research Crystal screen" 1 et 2 ont été utilisés (48 puits chaque). Ici, nous utilisons la technique de la goutte assise (cf. 2.3.2. Cristallographie). Le principe est toujours le même, soit la diffusion de vapeur, la position de la goutte par rapport au réservoir change. Elle est à côté du réservoir (goutte assise) plutôt que suspendue au-dessus (goutte suspendue). Cette technique est préférée lorsque les gouttes sont effectuées avec un robot.

À l'issue de ce premier criblage, trois conditions ont montré des cristaux de protéines : la condition A1 (plaque 24 puits) imidazole 0,1 M pH 8,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 M (Figure 33), les cristaux sont des aiguilles fines (Figure 34A). Des cristaux apparaissent (plaque 96 puits) dans la condition Tris sodium citrate 0,1 M pH 5,6, isopropanol 20 %, PEG 4 000 20 %. (Figure 34B). Des cristaux apparaissent (plaque 96 puits) dans la condition HEPES 100 mM pH 7,5, PEG 400 2 %, sulfate d'ammonium 2 M. (Figure 34C).

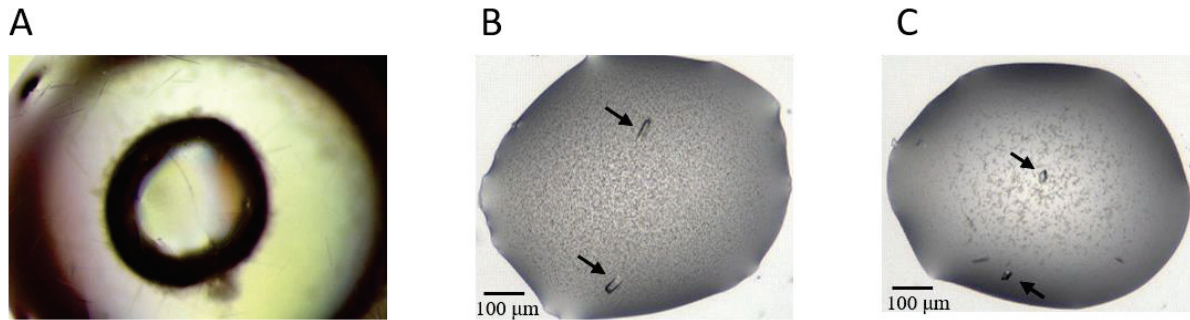


Figure 34 : Cristaux de *VuPLD*, premier criblage.

A) Condition A1 : imidazole 0,1 M pH 8,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 M. B) Tris Sodium Citrate 0,1 M pH 5,6, isopropanol 20 %, PEG 4 000 20 %. C) HEPES 100 mM pH 7,5, PEG 400 2 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M.

Ces cristaux ont plusieurs défauts :

- ils sont très petits, très fins ou en aiguilles et donc difficiles à pêcher ;
- ils sont peu nombreux, on ne retrouve que deux ou trois cristaux par goutte (Figure 34A) ;
- la condition de la Figure 34B est difficile à maîtriser car elle contient de l'isopropanol qui s'évapore entre la préparation et l'ouverture du puits.

Notons qu'hormis les cristaux en aiguilles de la Figure 34A qui approchent les conditions déjà publiées (Abergel et al., 2001) (1,6-1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 M NaCl, 0,1 M imidazole pH 8,5), les cristaux de la Figure 34B et C sont des conditions nouvelles.

3.1.2.2.3.2. Deuxième criblage

Le second criblage se focalise autour des conditions fructueuses du premier criblage afin de reproduire ces cristaux et d'affiner les conditions pour en obtenir de plus gros et de plus nombreux.

La protéine est concentrée à 9 mg/mL. Nous utilisons la technique de la goutte suspendue sur une plaque 24 puits où les gouttes sont effectuées à la main.

Concentration croissante en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ →

Boîte 2 : HEPES 0,1 M pH 7,5		1	2	3	4	5	6
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8 M	1,9 M	2 M	2,1 M	2,2 M	2,3 M
	PEG 400	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
B	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8 M	1,9 M	2 M	2,1 M	2,2 M	2,3 M
	PEG 400	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %
C	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8 M	1,9 M	2 M	2,1 M	2,2 M	2,3 M
	PEG 400	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
D	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8 M	1,9 M	2 M	2,1 M	2,2 M	2,3 M
	PEG 400	2,5 %	2,5 %	2,5 %	2,5 %	2,5 %	2,5 %

Concentration croissante en PEG 400 ↓

Concentration croissante en PEG 4000 →

Boîte 3 : Tris Sodium citrate 0,1 M pH 5,6		1	2	3	4	5	6
A	PEG 4000	14 %	16 %	18 %	20 %	22 %	24 %
	Isopropanol	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
B	PEG 4000	14 %	16 %	18 %	20 %	22 %	24 %
	Isopropanol	15 %	15 %	15 %	15 %	15 %	15 %
C	PEG 4000	14 %	16 %	18 %	20 %	22 %	24 %
	Isopropanol	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %
D	PEG 4000	14 %	16 %	18 %	20 %	22 %	24 %
	Isopropanol	25 %	25 %	25 %	25 %	25 %	25 %

Concentration croissante en isopropanol ↓

Concentration croissante en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ →

Boîte 4 : HEPES 0,1 M pH 7		1	2	3	4	5	6
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8 M	1,9 M	2 M	2,1 M	2,2 M	2,3 M
	PEG 400	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
B	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1,9 M	2 M	2,1 M	2,2 M	
	PEG 400		1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	
C	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1,9 M	2 M	2,1 M	2,2 M	
	PEG 400		2 %	2 %	2 %	2 %	
D	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$				2,1 M		
	PEG 400				2,5 %		

Concentration croissante en PEG 400 ↓

Figure 35 : Criblage des conditions de cristallogenèses, boîte 2, 3 et 4.

Les concentrations des solutions sont indiquées dans chaque puits. La protéine à 9 mg/mL (1 μL) est mélangée à 1 μL de la solution du puits. Chaque puits contient 500 μL de la solution de cristallogenèse. Les puits surlignés en rouge correspondent à une condition où des cristaux ont été obtenus.

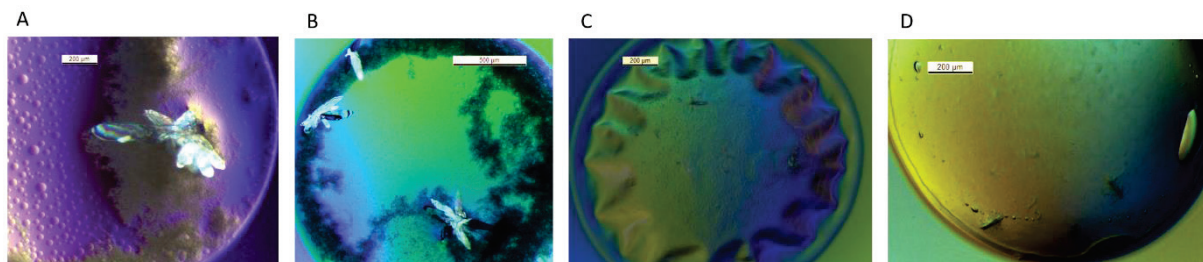


Figure 36 : Cristaux de VuPLD, second criblage.

A) Condition D4 boîte 3 : Tris Sodium Citrate 0,1 M pH 5,6, isopropanol 25 %, PEG 4 000 20 %.
 B) Condition D5 boîte 3 : Tris Sodium Citrate 0,1 M pH 5,6, isopropanol 25 %, PEG 4 000 22 %.
 C) Condition B2 boîte 4 : HEPES 100 mM pH 7,5, PEG 400 1,5 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,9 M. D) Condition C2 boîte 4 : HEPES 100 mM pH 7,5, PEG 400 2 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,9 M.

Les cristaux en Figure 36A et B sont des cristaux de sels. Nous avons essayé de pêcher le cristal en condition B2 de la boîte 4 (Figure 36C) sans succès car la solution a précipité au moment de pêcher le cristal. Le cristal de la condition C2 de la boîte 4 (Figure 36D) a été pêché puis congelé dans une solution de congélation composée de Tris Sodium Citrate 0,1 M pH 5,6, isopropanol 10 %, PEG 4 000 25 %, PEG 400 30 %.

3.1.2.2.3.3. Troisième criblage

Le troisième criblage reprend les conditions expérimentales du premier criblage, cette fois-ci en faisant varier le pH et non plus la concentration en sel (boîte 5). La boîte 6 crible des conditions autour des cristaux en aiguilles obtenus lors du premier criblage (imidazole 0,1 M pH 8,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 M). La protéine est concentrée à 8 mg/mL. Nous utilisons la technique de la goutte suspendue sur une plaque 24 puits où les gouttes sont effectuées à la main.

Aucun cristal n'a été obtenu au cours de ce criblage.

		Concentration croissante en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$					
Boîte 5 : Imidazole 0,1 M		1	2	3	4	5	6
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Imidazole 0,1 M pH 7,5	1,3 M pH 7,5	1,35 M pH 7,5	1,4 M pH 7,5	1,45 M pH 7,5	1,5 M pH 7,5	1,55 M pH 7,5
B	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Imidazole 0,1 M pH 7,8	1,3 M pH 7,8	1,35 M pH 7,8	1,4 M pH 7,8	1,45 M pH 7,8	1,5 M pH 7,8	1,55 M pH 7,8
C	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Imidazole 0,1 M pH 8,5	1,3 M pH 8,5	1,35 M pH 8,5	1,4 M pH 8,5	1,45 M pH 8,5	1,5 M pH 8,5	1,55 M pH 8,5
D	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Imidazole 0,1 M pH 9	1,3 M pH 9	1,35 M pH 9	1,4 M pH 9	1,45 M pH 9	1,5 M pH 9	1,55 M pH 9

Concentration croissante en Imidazole 0,1 M pH 7,5

		Concentration croissante en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$					
Boîte 6 : Imidazole 0,1 M pH 8,5		1	2	3	4	5	6
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NaCl	1,2 M 0 mM	1,3 M 0 mM	1,4 M 0 mM	1,5 M 0 mM	1,6 M 0 mM	1,7 M 0 mM
B	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NaCl	1,2 M 50 mM	1,3 M 50 mM	1,4 M 50 mM	1,5 M 50 mM	1,6 M 50 mM	1,7 M 50 mM
C	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NaCl	1,2 M 100 mM	1,3 M 100 mM	1,4 M 100 mM	1,5 M 100 mM	1,6 M 100 mM	1,7 M 100 mM
D	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NaCl	1,2 M 150 mM	1,3 M 150 mM	1,4 M 150 mM	1,5 M 150 mM	1,6 M 150 mM	1,7 M 150 mM

Concentration croissante en NaCl

Figure 37 : Criblage des conditions de cristallogenèses, boîtes 5 et 6.

Les concentrations des solutions sont indiquées dans chaque puits. La protéine à 8 mg/mL (1 μL) est mélangée à 1 μL de la solution du puits. Chaque puits contient 500 μL de la solution de cristallogenèse.

3.1.2.2.3.4. Quatrième criblage

Au cours de la concentration de la protéine lors de la préparation de l'échantillon, celle-ci a précipité au-delà d'une concentration de 1 mg/mL. Nous avons alors ajouté du NaCl à une concentration finale de 200 mM. Ceci nous permet de concentrer la protéine à 2,4 mg/mL.

Ici nous criblons de nouvelles conditions de cristallogenèse à l'aide d'un robot Mosquito avec 100 nL de protéine à 2,4 mg/mL et 100 nL de solution de cristallogenèse. Nous criblons 6 boîtes de 96 conditions avec des solutions de cristallogenèse issues de kits commerciaux :

- Classics-Suite qiagen ;
- JCSG MD ;
- PACT MD ;
- PEGs-I qiagen ;
- Salt-Grid hampton ;
- Wizard_I+II rigaku.

Au cours de ce criblage nous avons pu observer des sphérulites (Figure 38) qui correspondent à un début de précipité cristallin dans les conditions suivantes :

- Condition C11 du Kit PEGs-I qiagen : 0,1 M Mes pH 6,5, 20 % PEG 10 000.
- Condition F10 du Kit PACT MD : 0,02 M Sodium/Potassium Phosphate, 0,1 M BisTris Propane pH 6,5, 20 % PEG 3 350.

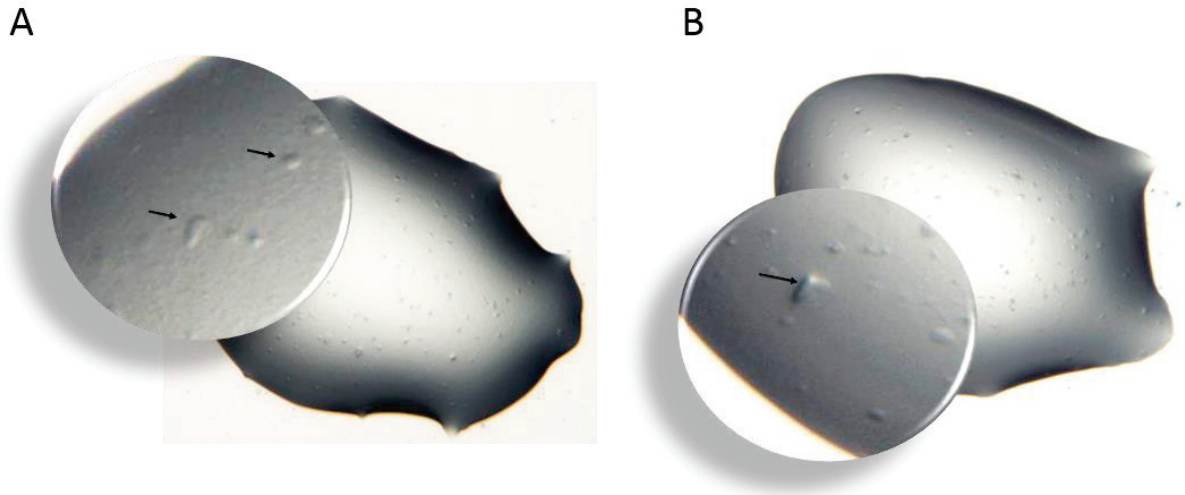


Figure 38 : Précipités cristallins de VuPLD obtenus au cours du quatrième criblage.

A) Condition C11 du Kit PEGs-I qiagen : 0,1 M Mes pH 6,5, 20 % PEG 10 000. B) Condition F10 du Kit PACT MD : 0,02 M Sodium/Potassium Phosphate, 0,1 M BisTris Propane pH 6,5, 20 % PEG 3 350.

3.1.2.2.3.5. Cinquième criblage

Avec la protéine issue de la même préparation que lors du quatrième criblage nous avons criblé autour des conditions des sphérulites obtenues (Figure 38) dans quatre boîtes. Nous utilisons la technique de la goutte suspendue sur deux plaques 24 puits où les gouttes sont effectuées à la main.

Dans la condition A6 de la boîte 9 deux petits cristaux sont observés. Leur collecte ainsi que la collection des données de diffraction correspondantes sont en cours.

		Concentration croissante en PEG					
Boîte 7 (PEG 3350) Boîte 8 (PEG 10000) Boîte 10 (PEG 20000) MES 0,1 M pH 6,5		1	2	3	4	5	6
A	PEG	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %
	Na ₃ PO ₄	0 mM	0 mM	0 mM	0 mM	0 mM	0 mM
B	PEG	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %
	Na ₃ PO ₄	15 mM	15 mM	15 mM	15 mM	15 mM	15 mM
C	PEG	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %
	Na ₃ PO ₄	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM
D	PEG	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %
	Na ₃ PO ₄	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM

Concentration croissante en Na₃PO₄

		Concentration croissante en Li ₂ SO ₄					
Boîte 9 : C ₂ H ₃ NaO ₂ 0,1 M pH 4,5		1	2	3	4	5	6
A	Li ₂ SO ₄	0 mM	0 mM	0 mM	0 mM	0 mM	0 mM
	PEG 400	35 %	40 %	45 %	50 %	55 %	60 %
B	Li ₂ SO ₄	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
	PEG 400	35 %	40 %	45 %	50 %	55 %	60 %
C	Li ₂ SO ₄	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM
	PEG 400	35 %	40 %	45 %	50 %	55 %	60 %
D	Li ₂ SO ₄	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM
	PEG 400	35 %	40 %	45 %	50 %	55 %	60 %

Concentration croissante en PEG 400

Figure 39 : Criblage de conditions de cristallogénèses, Boîtes 7, 8, 9 et 10.

Les concentrations des solutions sont indiquées dans chaque puits. La protéine à 2,4 mg/mL (1 μ L) est mélangée à 1 μ L de la solution du puits. Chaque puits contient 500 μ L de la solution de cristallogénèse.

3.1.2.2.4. Analyse des cristaux de *Vu*PLD

Devant notre insuccès à reproduire de meilleurs cristaux que ceux obtenus, nous avons fait diffracter aux rayons X les cristaux en notre possession. Ceci s'est effectué au Synchrotron ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) de Grenoble.

Les cristaux ont été, au préalable, pêchés, puis trempés dans une solution de congélation et enfin congelés à -80 °C (cf. 2.3.2.2. Criblage de conditions de cristallisations). Au synchrotron, les cristaux sont placés sous un flux constant d'azote pour maintenir leur température et des rayons X viennent faire diffracter les protéines cristallisées. La technique de diffraction aux rayons X consiste à faire passer un rayon X à travers le cristal de protéines. Au contact des électrons composant les atomes de la protéine, les rayons X diffractent. Un détecteur collecte alors les taches de diffractions dont l'analyse nous permet de connaître la composition du cristal, la taille de la maille et la résolution.

Il s'avère que tous les cristaux testés ont le même groupe d'espace orthorhombique $P22_12_1$ qui correspond à une maille parallélépipédique (angles $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), et dont les valeurs diffèrent très légèrement ($a = 58,15 \text{ \AA}$, $b = 73,55 \text{ \AA}$, $c = 84,91 \text{ \AA}$ pour les conditions des Figure 34A et B) et ($a = 58,23 \text{ \AA}$, $b = 68,05 \text{ \AA}$, $c = 92,64 \text{ \AA}$ pour la condition de la Figure 36D).

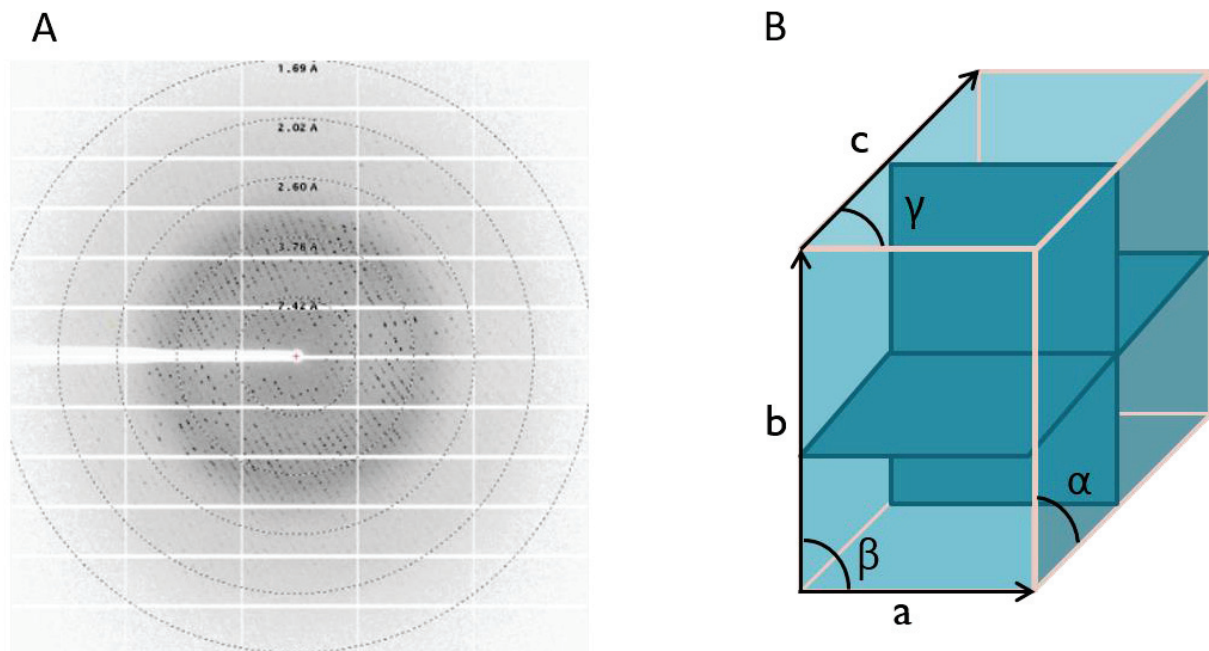


Figure 40 : Analyse de la diffraction aux rayons X.
 A) Cliché de diffraction à 1.69 Å du cristal de la condition Tris Sodium Citrate 0,1 M pH 5,6, isopropanol 20 %, PEG 4 000 20 %. B) Représentation schématique de la maille orthorhombique du cristal : $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $a = 58,15 \text{ \AA}$, $b = 73,55 \text{ \AA}$, $c = 84,91 \text{ \AA}$).

Des données ont été collectées avec la condition de la Figure 34A ; la résolution est alors de 1,9 Å. Avec le cristal de la Figure 34B, la résolution est de 1,69 Å (Figure 40).

Ce niveau de résolution est optimal dans l'optique de résoudre une structure 3D. Cependant, malgré la qualité de ces données nous n'avons pas été capables de reproduire ces cristaux et donc de pouvoir phaser le signal en produisant des dérivés appropriés, nécessaires pour produire une cartographie détaillée de densité électronique des cristaux correspondants.

Par ailleurs, la taille de maille nous indique qu'elle ne peut pas contenir l'enzyme dans sa totalité mais seulement un fragment d'environ 300 résidus. Compte tenu des potentiels effets de symétrie à l'intérieur de la maille, celle-ci peut contenir toutes les subdivisions possibles (2 x 150 résidus, 3 x 100 résidus, ...) (Figure 41).

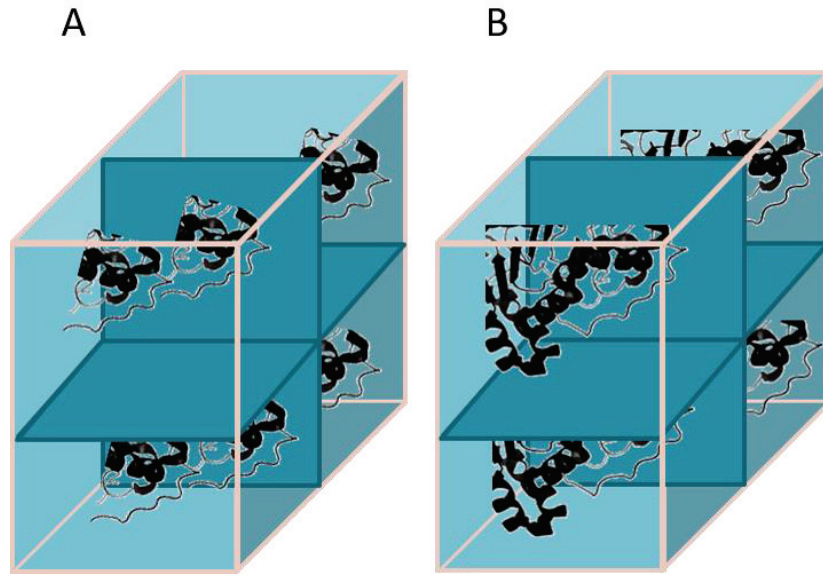


Figure 41 : Schéma de la maille des cristaux de *VuPLD*.

A) Schéma de la maille avec deux fragments de 150 résidus dans l'unité asymétrique. B) Schéma de la maille avec un seul fragment de 300 résidus dans l'unité asymétrique.

Il n'est donc pas possible à l'heure actuelle de savoir ce qui cristallise dans nos conditions. Il pourrait s'agir d'un fragment de l'enzyme, auquel cas en modélisant ce fragment on pourrait résoudre la structure par remplacement moléculaire. Cependant on ne sait pas quel fragment de l'enzyme cristallise. Il pourrait aussi s'agir de la cristallisation d'un contaminant de purification.

Afin d'identifier ce qui cristallise nous avons envisagé de produire des cristaux pour identifier la séquence protéique par spectrométrie de masse. Cependant, les rares cristaux que nous avons reproduits étaient ou bien des cristaux de sel ou bien des cristaux de protéines que nous avons faits diffracter aux rayons X dans l'optique d'obtenir une maille différente, telle qu'elle puisse contenir toute la protéine.

3.1.2.2.5. Analyse structurale par SAXS et modèle à basse résolution

De façon à avoir une information structurale sur la *VuPLD* et parce que nous avons des quantités suffisantes de cette protéine dans des conditions exploitables, nous avons effectué des expériences de SAXS.

Le SAXS est une technique de mesure de la diffusion de rayons X à travers une solution de protéine. Elle permet l'analyse structurale, l'étude de processus cinétiques, de transitions structurales ou de changements conformationnels des macromolécules biologiques en solution.

Cette méthode ne requiert pas de cristaux et n'est pas limitée par la taille de la macromolécule, ce qui la rend applicable dans des conditions physiologiques (cf. 2.3.3. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)).

Nous avons déjà observé le caractère homogène de la PLD en solution ; cependant les dernières préparations avaient une tendance importante à précipiter à de faibles concentrations. Ainsi, pour réaliser les expériences de SAXS, on effectue d'abord une chromatographie par filtration sur gel de l'échantillon protéique pour exclure les agrégats.

Toutes les expériences de SAXS sont réalisées avec l'échantillon de VuPLD du dernier criblage de cristallogénèse (purification n° 30 à 45 Tableau 5) Cet échantillon a déjà été purifié par filtration sur gel. Nous testons quatre conditions afin de s'affranchir le plus possible d'agrégats protéiques :

- Après la première filtration sur gel, l'échantillon est conservé à -80 °C
- Après la première filtration sur gel, l'échantillon est conservé à 4 °C
- L'échantillon est re-purifié par filtration sur gel et conservé à -80 °C
- L'échantillon est re-purifié par filtration sur gel et conservé à 4 °C

Nous testons plusieurs concentrations protéiques de 2,55 à 0,015 mg/mL afin d'éviter de faire diffuser des agrégats de protéine.

Seules les concentrations les plus élevées, 2,5 mg/mL et 1 mg/mL, nous permettent d'étudier la protéine et de pouvoir modéliser à partir du signal obtenu (Figure 42).

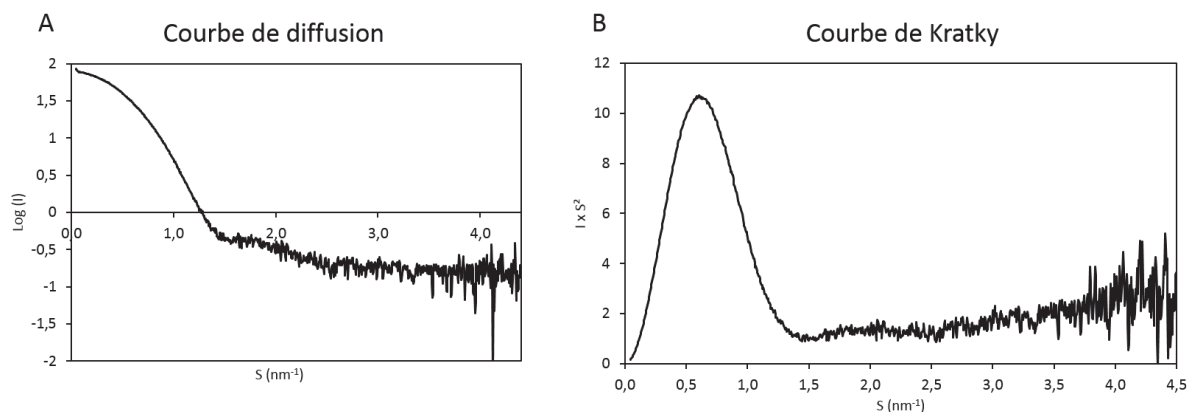


Figure 42: Analyse structurale de VuPLD par SAXS.

I est l'intensité des vecteurs de diffusion et S est l'inverse de la taille de ces vecteurs (nm^{-1}). A) Courbe de diffusion $\log(I)$ par rapport à S . B) La courbe de Kratky $I \times S^2$ par rapport à S indique que la protéine est repliée.

Après purification par filtration sur gel et conservation de la protéine à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, le SAXS nous permet de déterminer le rayon de giration (R_g) de la protéine qui est de $2,81 \pm 0,05\text{ nm}$, un diamètre maximum (D_{max}) de $9,89\text{ nm}$ et une masse théorique de $89,11\text{ kDa}$. La courbe de Kratky (I^*S^2 par rapport à S en nm^{-1}) est une représentation illustrant le repliement de la protéine (cf. 2.3.3. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)). Par comparaison, la masse théorique calculée à partir de la séquence est de $91,5\text{ kDa}$ ce qui est assez proche des $89,11\text{ kDa}$ déterminés en SAXS ; le R_g est quasiment le même que pour la PLD de chou ($2,89 \pm 0,01\text{ nm}$) (Stumpe et al., 2007). Par contre, il semble que la *Vu*PLD soit plus allongée que la PLD de chou dont la D_{max} est de $8,5\text{ nm}$ (Figure 14).

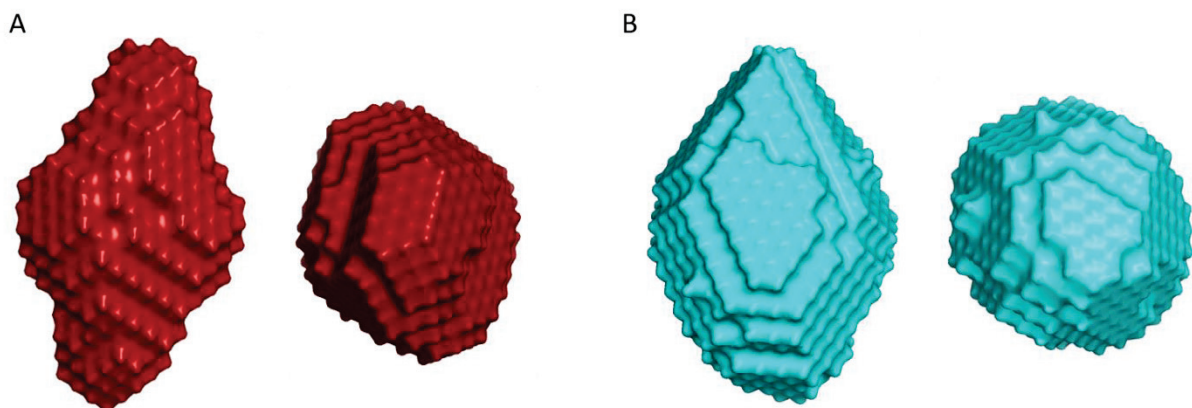


Figure 43 : Modèles calculés à partir des données SAXS.

A) Calcul avec le programme DAMMIN (20 cycles). B) Calcul avec le programme GASBOR (50 cycles).

Le programme DAMMIN (Svergun, 1999) modélise une protéine symétrique (Figure 43A) en forme d'ovoïde avec des extrémités effilées et un cœur plus élargi. Ce modèle est assez proche de celui obtenu par l'équipe de Renate Ulbrich-Hoffman (Stumpe et al., 2007) avec la PLD de chou. Le modèle proposé par le programme GASBOR (Svergun et al., 2001) est moins symétrique (Figure 43B). Ce modèle possède une base plus importante, un cœur élargi et une extrémité en pointe dénotant dans ce cas une relative asymétrie.

Ces deux modèles (Figure 43) demeurent proches du modèle de la PLD de chou. La partie flexible décrite par Stumpe *et al.* ne semble pas aussi évidente ici et il est difficile de savoir s'il s'agit d'une réelle différence entre les protéines ou bien d'une différence expérimentale. Par ailleurs cette enveloppe ne permet pas d'identifier la position du domaine C2.

Le domaine C2 est le domaine régulateur de la PLD qui fixe le Ca^{2+} , cofacteur indispensable à l'activité enzymatique. Il semble que la fixation du Ca^{2+} entraîne un bouleversement structural

(Zheng et al., 2000) permettant l'exposition de zones hydrophobes à la surface de la protéine et favorisant ainsi son adsorption aux membranes.

En comparant, le modèle SAXS de la PLD avec et sans Ca^{2+} nous avons l'opportunité d'observer ce changement structural et donc de définir la position relative du domaine C2 par rapport au cœur catalytique. À cette fin, nous avons essayé de reproduire la même expérience en présence de l'activateur de l'enzyme, 20 mM de Ca^{2+} qui est la concentration à laquelle l'activité PLD est mesurée en présence du substrat dans des micelles mixtes de SDS/Triton-X100.

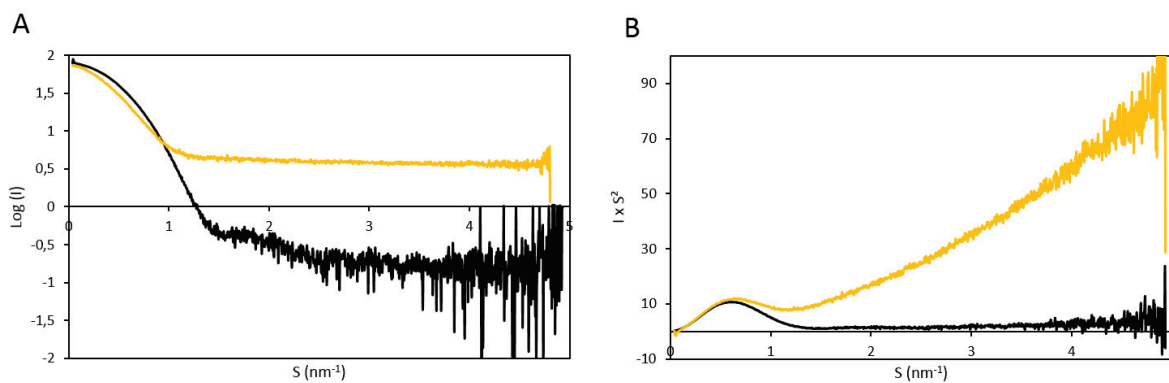


Figure 44 : Analyse structurale de *Vu*PLD par SAXS en présence de Ca^{2+} .

La courbe noire correspond aux données de SAXS sans Ca^{2+} , la courbe jaune correspond aux données de SAXS en présence de 20 mM de Ca^{2+} . A) Courbe de diffusion. B) La courbe de Kratky indique que la protéine est repliée en noire et présente une dénaturation partielle en jaune.

De façon tout à fait surprenante on observe une dénaturation partielle de l'enzyme en présence de Ca^{2+} (Figure 44B). Un tel phénomène ne nous permet pas de modéliser la protéine en présence de son activateur.

La concentration de Ca^{2+} que nous avons testée n'est pas une concentration physiologique. Elle nous permet de mesurer l'activité PLD au cours d'un test enzymatique où :

- la PLD est en présence de substrat (PC/SDS/Triton), d'une sonde fluorescente ou bien d'enzymes reportrices pour quantifier la libération du produit ;
- la quantité d'enzyme utilisée est beaucoup moins importante qu'en SAXS. En SAXS, nous préparons 50 μL d'une solution à 1 mg/mL minimum. Ceci correspond à 50 μg de protéine. Dans un test enzymatique avec *Vu*PLD pure nous utilisons 10 ng d'enzyme, soit 5 000 fois moins de protéines.

Nous avons donc refait l'expérience mais en essayant plusieurs concentrations en Ca^{2+} . Nous sommes restés à des concentrations où l'activité PLD est mesurable et compte tenu de la quantité restante en protéine nous avons fait quatre points à 0, 5, 10 et 20 mM de Ca^{2+} (Figure 45).

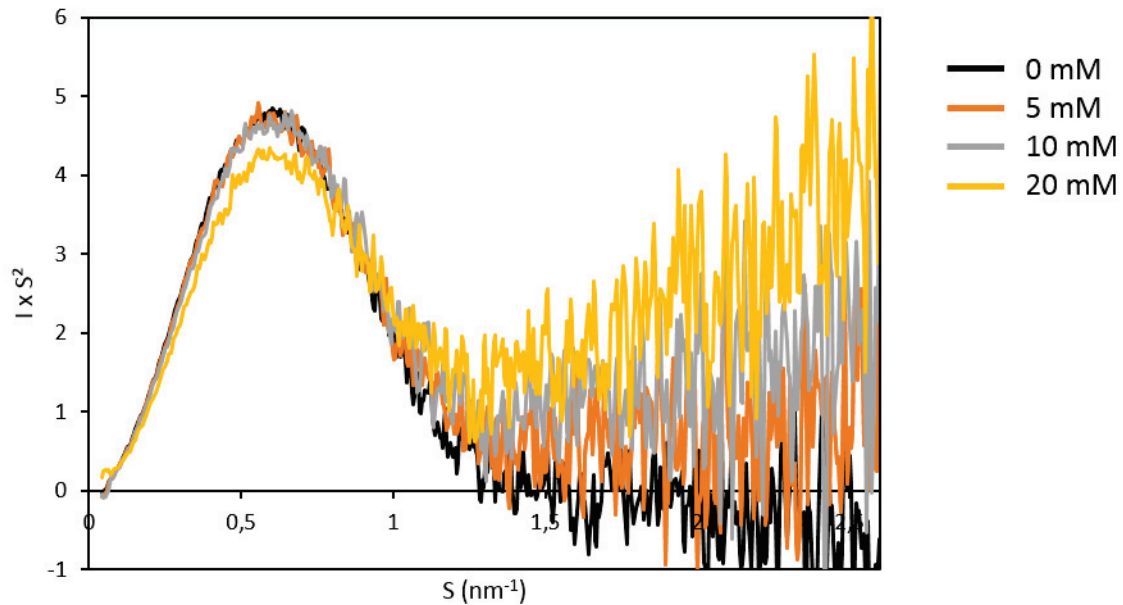


Figure 45 : Courbe de Kratky des données de SAXS en présence de 0 à 20 mM de Ca^{2+} . La courbe noire correspond aux données de SAXS sans Ca^{2+} , la courbe orange correspond aux données de SAXS en présence de 5 mM de Ca^{2+} , la courbe grise correspond aux données de SAXS en présence de 10 mM de Ca^{2+} , la courbe jaune correspond aux données de SAXS en présence de 20 mM de Ca^{2+} .

Dans cette expérience, réalisée avec le même échantillon que précédemment où la protéine a subi plusieurs cycles de congélations/décongélations, $Vu\text{PLD}$ est sensible à la concentration et précipite à partir de 0,8 mg/mL. Ici nous utilisons donc cette concentration qui ne nous permet pas d'obtenir un jeu de données de qualité suffisante pour calculer un modèle. Cependant on peut étudier le comportement de la protéine vis-à-vis du Ca^{2+} .

Ces résultats confirment ce que nous voyions précédemment : il semble que le Ca^{2+} dénature partiellement la protéine. De fait, pour des concentrations croissantes en Ca^{2+} on observe une dénaturation de plus en plus importante (Figure 45).

3.1.2.2.6. Discussion

La concentration de Ca^{2+} utilisée ici n'est pas une concentration physiologique et si l'on détecte l'activité PLD avec une telle concentration il faut mentionner que la PLD n'est pas le seul

élément du test qui comprend aussi des micelles mixtes de substrats/détergents et des enzymes pour la détection couplée de l'activité PLD. Toutefois, de précédentes études structurales utilisant le dichroïsme circulaire et la titration microcalorimétrique utilisent des concentrations jusqu'à 1 mM de Ca^{2+} (Zheng et al., 2000). Les auteurs observent alors des mouvements structuraux quand le Ca^{2+} se fixe. Certains changements sont réversibles avec ajout d'un chélateur comme l'EGTA et d'autres ne le sont pas. En réalité l'ajout d'EGTA, chélateur de Ca^{2+} , permet de retrouver une conformation proche de la conformation de départ mais pas exactement la même pour autant. Ils observent ainsi des conformations mal repliées ou partiellement repliées. Ces résultats sont en accord avec ce que nous voyons dans nos données de SAXS. Le Ca^{2+} semble bien provoquer une dénaturation partielle.

De plus, ces expériences de SAXS en présence de Ca^{2+} manquent de contrôles internes que nous n'avons pas pu effectuer, faute de quantité suffisante de protéines. Nous aurions pu tester d'autres sels ioniques non activateurs de la PLD pour vérifier si l'effet observé est dû au Ca^{2+} en tant qu'activateur ou en tant que sel. Nous aurions aussi pu tester des concentrations physiologiques de Ca^{2+} qui sont d'environ 0,1 μM à l'état basal chez *A. thaliana* (Knight et al., 1997).

Ces travaux amènent à penser que l'on travaille avec une enzyme très particulière dont on contrôle difficilement l'attitude en solution. La vraie faiblesse de ce protocole est que la quantité de protéines produite est trop faible pour mener à bien des essais de cristallisation. Notre protocole actuel nous force à combiner plusieurs purifications, ce qui n'est jamais recommandé car les échantillons de différentes purifications sont tous différents. Combiner des purifications revient à obtenir un échantillon somme toute très hétérogène, même en ajoutant une étape de purification avec la filtration sur gel. Nous ne sommes donc pas dans des conditions idéales, ce qui est un vrai biais pour des expériences qui requièrent une homogénéité maximale.

Deux explications permettent de comprendre pourquoi nous n'avons pas plus de protéines.

Tout d'abord nous utilisons le système d'expression *P. pastoris* de façon constitutive, ce qui n'est pas le meilleur moyen pour accumuler de grandes quantités de protéines recombinantes. À l'heure actuelle, nous produisons moins d'1 mg de protéines par litre de culture. Un système inductible permettrait sûrement d'augmenter la production de la PLD. Par ailleurs, la levure *P. pastoris* est un système d'expression connu pour glycosyler de manière exacerbée les protéines qu'elle produit de façon recombinante (Bretthauer and Castellino, 1999). C'est donc un paramètre supplémentaire qui introduit de l'hétérogénéité. Il est aussi possible d'envisager

d'autres organismes de production de protéines recombinantes, les cristaux de *VuPLD* obtenus en 2000 (Abergel et al., 2001) étaient par exemple criblés avec une protéine produite en cellules d'insecte. Le système *E. coli* ne fonctionne pas pour toutes les PLD végétales mais certaines comme le chou et le ricin sont produites avec succès dans ce système d'expression. En réalité, les avantages que constituent la production dans un système eucaryote (modifications post-traductionnelles et une protéine produite plus proche de sa réalité *in planta*) que confère un système comme *P. pastoris* peuvent s'avérer désavantageux dans le cadre d'un projet de structure car ils introduisent de l'hétérogénéité.

Ensuite, la méthode de purification qui combine la chromatographie hydrophobe et la chromatographie d'affinité avec laquelle nous avons un rendement moyen de 25 % n'est pas assez efficace. Un système avec une étiquette et une élution plus spécifique permettraient de purifier une plus grande quantité de protéines en une seule étape. Notons ici que les conditions très particulières de cette purification sont susceptibles de sélectionner un isoforme de l'enzyme. Dans la littérature il est en effet montré que les PLD végétales purifiées sur ce type de colonne sont toutes clivées en N-terminal. Nos travaux montrent pourtant que toute la PLD produite dans notre système recombinant n'est pas clivée. Cet aspect, ainsi que le clonage d'une PLD avec une étiquette, sera approfondi dans le chapitre suivant.

Enfin, malgré ces limites techniques quant à la production de l'enzyme, nous nous devons de noter que la PLD a toujours réagi différemment selon les préparations et qu'elle est intrinsèquement instable. Cela peut être dû à l'aspect partiellement hydrophobe de ce type d'enzyme qui rend sa concentration à des niveaux élevés particulièrement complexe, difficile à maîtriser et jamais identique.

3.1.2.2.7. Conclusions & perspectives

L'implication de la PLD dans le métabolisme est de première importance. En effet, on la retrouve impliquée dans de nombreux mécanismes dont la dérégulation est à la base de pathologies majeures. Si la fonction de la PLD est de mieux en mieux définie, la structure 3D de l'enzyme eucaryote demeure un véritable point d'interrogation pour porter plus en avant la recherche sur ce sujet. Malgré la découverte de la structure 3D d'une PLD procaryote en 2001 (Leiros et al., 2000), la faible homologie de séquence entre cette protéine et les PLD eucaryotes empêche de modéliser de façon fiable la structure 3D de ces dernières.

Notre étude structurale s'attache donc à définir la structure de telles enzymes chez le végétal avec pour objet d'étude la *Vu*PLD. Il s'agit ici de définir la structure du site catalytique HKD chez les eucaryotes mais aussi celle du domaine régulateur et sa position par rapport au cœur catalytique.

Le criblage de conditions de cristallogénèse a donné lieu à plusieurs cristaux et précipités cristallins. Cependant, si la résolution est optimale (1,69 Å) la taille de la maille cristalline ne permet pas de contenir toute l'enzyme mais seulement une portion de celle-ci. Il est aussi possible que nous nous trouvions dans les conditions où un contaminant cristallise. Or, le peu de cristaux obtenus ne nous a pas permis d'identifier ce qui cristallisait.

Nous avons donc changé de stratégie pour obtenir une structure à basse résolution par la méthode de SAXS. Nous avons alors deux objectifs :

- définir la forme globale de la *Vu*PLD et la comparer à celle de chou obtenue en 2007 par une équipe allemande (Stumpe et al., 2007)
- définir la position du domaine C2 relativement au cœur catalytique en faisant apparaître le changement structural de celui-ci en présence de Ca^{2+} .

Nous avons pu définir le premier point et il apparaît que la forme globale de la *Vu*PLD est relativement proche de celle de chou. Ceci est tout à fait attendu pour deux enzymes qui partagent 80,8 % d'identité de séquences protéiques.

Pour le second point, les rayons X ont la propriété de former des radicaux au sein des protéines ce qui favorise leur agrégation et ainsi l'augmentation du signal aux petits angles. Il semble ici que *Vu*PLD soit plus sensible aux rayons X quand elle est en présence de Ca^{2+} .

Il est possible aussi que l'action du Ca^{2+} sur l'enzyme permette de découvrir une zone hydrophobe permettant à la PLD de s'adsorber à son substrat insoluble. Dans ce cas en l'absence de substrat, ce qui est le cas des expériences SAXS, on comprend que l'enzyme ait une plus forte tendance à s'agréger par interactions hydrophobes.

Le principal atout dont bénéficierait ce projet serait de pouvoir produire plus de protéines en une seule purification, de façon à pouvoir cribler plus de conditions de cristallisation avec plus de protéines.

3.1.2.3. Étude structurale *in silico* de la PLD

Les outils de bioinformatique actuels nous permettent de modéliser les structures protéiques dont la résolution expérimentale échoue ou bien s'avère trop compliquée. Dans cette partie nous développerons une analyse qui nous permettra non pas d'obtenir un modèle de la PLD végétale mais une topologie des structures secondaires, soit l'organisation des structures secondaires de la PLD végétale dans un espace 3D.

Cette analyse en deux parties s'attache à étudier, chez l'*AtPLD α* :

- la structure primaire ;
- la structure secondaire.

Ces deux points seront mis en perspectives par rapport aux structures existantes des PLD procaryotes. Nous discuterons alors des différents modèles que nous avons essayé de construire pour enfin conclure avec une proposition d'une typologie 3D pour la PLD végétale.

3.1.2.3.1. Analyse de la structure primaire

L'analyse *in silico* de la structure de la PLD végétale qui suit s'affranchit du domaine C2. En effet, nous verrons par la suite que les modèles les plus justes se basent sur la structure existante de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF. Nous divisons donc la PLD végétale en deux parties, le domaine régulateur C2 et le cœur catalytique, objet de notre étude. Le cœur catalytique est long de 660 résidus après délétion des 150 résidus du domaine C2. Nous pourrions diviser cette séquence en deux parties égales de 330 résidus cependant la prédiction de structure secondaire que nous faisons au cours de ces travaux nous indique que des brins β similaires se trouve en début et fin de séquence du premier lobe. Ainsi le premier lobe N-terminal qui comment au résidu V151 se termine au E457 et se trouve raccourci de 23 résidus. Le second lobe C-terminal commence au D458 et est long de 353 résidus.

Bien avant de connaître la structure 3D des PLD procaryote, Ponting & Kerr (Ponting and Kerr, 1996) décrivaient déjà cette protéine comme bilobée avec chaque lobe portant une série de quatre motifs particuliers. Ils établissent cette conclusion en alignant plusieurs PLD issues des règnes bactériens, viraux et végétaux. Cette constatation est développée en introduction et on retrouve évidemment ces quatre domaines dans l'*AtPLD α* (Figure 9 et Figure 46) :

VEEDRNWNMGIKSAKFPGVPTFFSQRQGCKVSLYQDAHIPDNFVPRIPLAGGKNYEPQRCWEDIFDT
 ISNAKHLIYITGWSVYAEIALVRDSRRPKPGGDVTIGE L L K K K A S E G V R V L L I V W D D R T S V D V L K K D G
 L M A T H D E E T E N F F R G S D V H C I L C P R N P D D G G S I V Q S S Q I S T M F T H H Q K I V V V D S E M P S R G G S E M R R I V
 S F V G G I D L C D G R Y D T P F H S L F R T L D T V H H D D F H Q P N F T G A A I T K G G P R E P W H D I H S R L E G P I A W D V M Y
 N F E Q R W S K Q G G K D I L V K L R D L S D I I T P S P V M F Q E D H D V W N V Q L F R S I D G G A A G F P E S P E A A A E A G L
 V S G K D N I T D R S I Q D A Y I H A I R R A K D F I Y V E N Q Y F L G S S F A W A A D G I T P E D I N A L H L I P K E L S L K I V S K
 I E K G E K F R V Y V V V P M W P E G L P G S G S A Q A I L D W Q R R T M E M M Y K D V I Q A L R A Q G L E E D P R N Y L T F F C L G N
 R E V K K D G E Y E P A E K P D P D T D Y M R A Q E A R R F M I Y V H T K M M I V D D E Y I I I G S A N I N Q R S M D G A R D S E I A M
 G G Y Q P H H L S H R Q P A R G Q I H G F R M S L W Y E H L G M L D E T F L D P S S L E C I E K V N R I S D K Y W D F Y S S E S L E H D
 L P G H L L R Y P I G V A S E G D I T E L P G F E F F P D T K A R I L G T K S D Y L P P I L T T

Figure 46 : Représentation des domaines dupliqués dans l'*AtPLD α* .
 Les motifs selon Ponting & Kerr (Ponting and Kerr, 1996) sont indiqués : le motif 1 est en jaune, le motif 2 est en vert, le motif 3 en rouge correspond au motif HKD et le motif 4 est en bleu.

Ainsi il semble que la structure bilobée des PLD mette en regard des motifs similaires dans chaque lobe. Nous avons donc aligné les deux lobes de l'*AtPLD α* afin de déterminer les zones conservées et les domaines communs.

On note que les domaines décrits par Ponting & Kerr (Ponting and Kerr, 1996) s'alignent quasiment tous entre eux entre les deux lobes de l'enzyme (Figure 47). Ce n'est pas le cas du motif 4 mais l'*AtPLD α* , comme toutes les PLD végétales, possède une insertion dans cette région du premier motif catalytique par rapport aux autres PLD du vivant.

La structure étant plus conservée que la séquence, nous nous sommes intéressés à la structure secondaire de cette enzyme.

```

Lobe 1      VEEDRN-WNM-----GIKSAKFPQVPTFFSQRQGCKVSLYQDAHI PDNFVPRIPLAG
Lobe 2      ---DHDVWNVQLFRSIDGGAAAGFPESPEA--AAEAG-----LVS
           *:: ** :      * : * ** * : : . *      *..

Lobe 1      GKNYEPQRCWEDIF-DTISNAKHLLIYITG-WSVYAEIALVRDSRRPKPGGDVTIGE L L K K
Lobe 2      GKDNITDRSIQDAYIHAIRRAKDFIYVENQYFLGSSFAWAADGITPE---DINALHLIPK
           **: .:* .:* : :.* .**:**: . : : ::* . * . * : * : . * : *

Lobe 1      KAS-----EGVRVLLLV-----WDDRTSVDVLKKDGLMATHD
Lobe 2      ELSLKIVSKIEKGEKFRVYVVVPMWPEGLPGSGSAQAILDWQRRT-MEMMYKDVIQALRA
           : *      * .** ::*      * : ** : : : * * : * :

Lobe 1      EETENFFRGSVDVHCILCPR-----NPDDGGSIVQSSQISTMFTH-HQKIVVVD
Lobe 2      QGLEEDPRNYLTFCLGNREVKKDGGEYEPAEKPDPTDYMRAQEARRFMIYVHTKMMIVD
           : * : * . . * *      : ** . . : : : : : : * * : : **

Lobe 1      SEMP SRGGSEM-RRIVSFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHHDDFHQPNTGAAITK
Lobe 2      DEYII IGSANINQRSMDGARDSEIAMGGYQ-P-----HHLSHRQP-----AR
           .*      * : : : : * : . . . : . * * : *      * * . : * * : :

Lobe 1      G---GPREP-WHDIH-----SRLE-----GPIA---WDVMYNFEQ-----
Lobe 2      GQIHGFRMSLWYE-HLGMLDETFLDPSLEECIEKVNRI SDKYWD-FYSSESLEHDLPGHL
           * * * . * : : *      * **      . * : * * : * . *

Lobe 1      -RW----SKQGKGDIL-----VKLRDL---SDIITPSPVMFQE
Lobe 2      LRYPIGVASEG--DITELPGFEFFPDTKARILGTKSDYL--P-PIL-TT
           * :      : : * **      . * * * ** : * * : :
    
```

Figure 47 : Alignement des séquences des deux lobes de l'*AtPLDα*.
 Les motifs selon Ponting & Kerr (Ponting and Kerr, 1996) sont indiqués : le motif 1 est en jaune, le motif 2 est en vert, le motif 3 en rouge correspond aux motifs HKD et le motif 4 est en bleu.

3.1.2.3.2. Analyse de la structure secondaire

Pour analyser cette protéine, nous avons tout d'abord réalisé une prédiction des structures secondaires de chaque lobe séparément à l'aide du serveur PSIPRED v3.3 (cf. 2.2.1.2. Modélisation de structures protéiques).

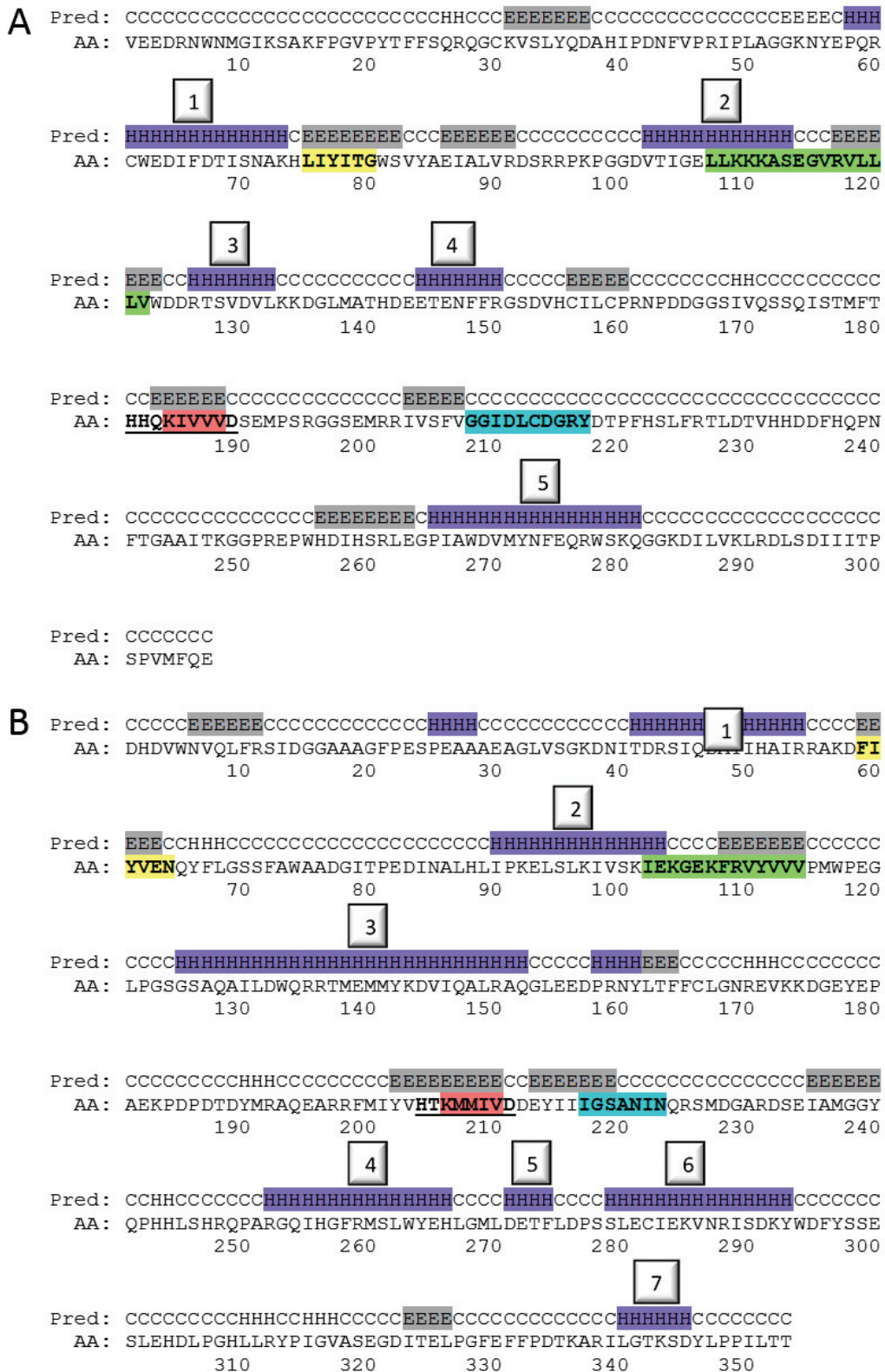


Figure 48 : Prédiction des structures secondaires des lobes du côté N-terminal et C-terminal d'AtPLD. A) Lobe N-terminal. B) Lobe C-terminal. Les hélices α sont surlignées en violet (compte tenu du fait qu'il y a 3,6 résidus par tour dans une hélice α , seules les hélices de plus de quatre résidus sont indiquées), les brins β sont surlignés en gris. Les principales hélices α sont numérotées. Les motifs décrits plus haut sont en gras et colorés comme précédemment. Le motif HKD est en gras souligné.

On observe 5 hélices α sur la prédiction du lobe du côté N-terminal (Figure 48A) alors qu'on n'en observe sept sur la seconde prédiction (lobe C-terminal) (Figure 48B). En termes de position relative dans la séquence, on note que les hélices 1 et 2 de chaque lobe peuvent correspondre entre elles. Cependant l'hélice 3 du second lobe (Figure 48B) semble correspondre aux hélices 3 et 4 du premier lobe (Figure 48A). Ainsi l'hélice en aval, hélice 5 du premier lobe (Figure 48A) correspondrait à l'hélice 4 du second lobe (Figure 48B).

On note que les motifs décrits précédemment et soulignés par Ponting & Kerr en 1996 sont étroitement liés à des structures secondaires. Ainsi le premier motif (en jaune) est un brin β , le second motif (en vert) serait l'enchaînement d'une hélice α et d'un brin β . Le troisième motif correspondant au motif HKD (en rouge) est un brin β . Enfin, le quatrième et dernier motif n'est pas structuré dans le premier lobe mais est très proche d'un brin β ; dans le second lobe il est partiellement prédit comme un brin β .

Afin de faire correspondre les structures secondaires en regard dans la forme bilobée de l'enzyme nous avons réalisé un alignement des deux lobes du cœur catalytique comme précédemment avec le serveur PROMALS3D qui indique les structures secondaires consensus. Les résultats sont présentés dans la Figure 49.

H catalytique du motif HKD N-terminal. Nos modèles indiquent que le D689 ou le E691 sont tous deux à des distances adéquates pour remplir ce rôle même si le E691 est plus proche. Ici l'alignement de structure secondaire semble indiquer que le D407 est en regard du E691. À partir de ces résultats, on peut établir une topologie de structure pour l'*AtPLD α* .

Aussi, on négligera les hélices et les brins de moins de quatre résidus. On négligera aussi les structures secondaires non alignées. On obtient ainsi une topologie (Figure 50), pour un lobe, de type :

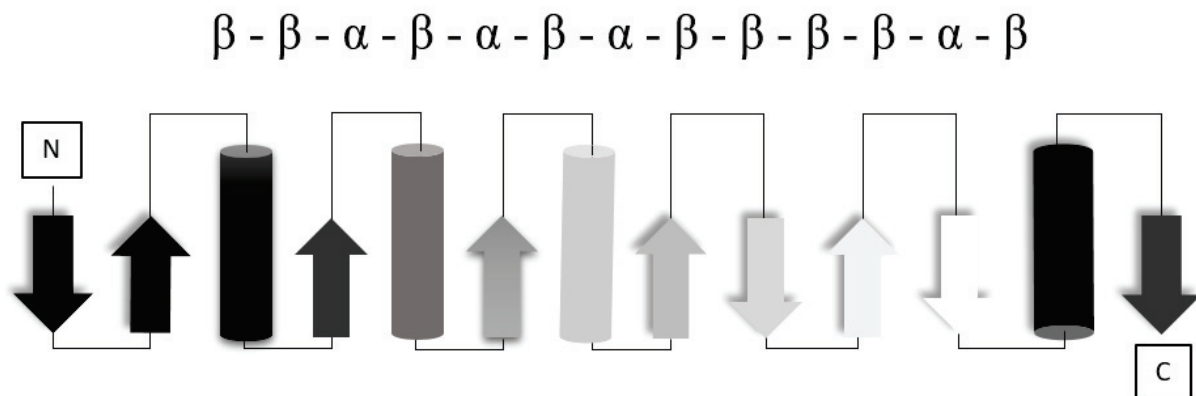


Figure 50 : Topologie schématique proposée pour un lobe de l'*AtPLD α* . Les flèches représentent les brins β , les cylindres représentent les hélices α . N : extrémité aminoterminal. C : extrémité carboxy-terminal.

Cette typologie répond à celle décrite pour la PLD de *Streptomyces sp.* PMF (Leiros et al., 2000) qui possède un repliement typique nommé « repliement α/β -hydrolase » qui consiste en un feuillet β constitué de brins β parallèles entourés d'hélices α dans une topologie en sandwich α - β - α - β .

3.1.2.3.3. Quel modèle pour construire par homologie ?

La modélisation par homologie est une méthode de modélisation de structure 3D des protéines. Si son pendant, la modélisation *ab initio*, ne se fonde que sur la séquence pour construire un modèle, la modélisation par homologie se base sur un homologue de la protéine dont la structure est connue. En partant du principe que la structure est mieux conservée que la séquence, un homologue même lointain peut avoir une structure relativement similaire. Ainsi on considère une séquence homologue à une autre à partir de 30 % d'identité de séquence et de fait, deux protéines qui ont plus de 30 % d'identité de séquence ont 80 % de leurs carbones α

superposables avec un RMSD de 1 Å. Le RMSD ou *Root-Mean-Square Deviation* est une distance moyenne représentative de l'écart entre deux structures protéiques superposées.

Une autre méthode de modélisation, le « *threading* », se fonde sur l'identification de repliement. Une séquence est testée sur une librairie de repliement pour déterminer sa compatibilité structure-séquence probable.

Aujourd'hui, les serveurs que nous avons utilisés pour modéliser la structure 3D de l'*AtPLD* α , trouvent eux-mêmes l'homologue adéquat à la modélisation et réalisent d'eux-mêmes l'alignement de séquence. Certains proposent même plusieurs modèles basés sur des homologues différents.

Nous avons utilisé deux serveurs différents : I-TASSER (*threading*) et Phyre2 (homologie) (cf. 2.2.1.2. Modélisation de structures protéiques).

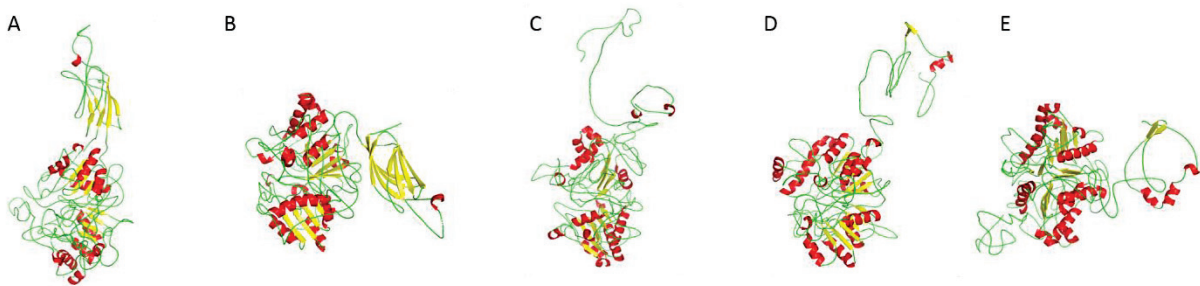


Figure 51: Modélisation de l'*AtPLD* entière par les deux serveurs Phyre2 et I-TASSER. A) Serveur Phyre2 en mode intensif, 73 % des résidus modélisés avec plus de 90 % de confiance. B) Serveur Phyre2 en mode normal. C) D) et E) Serveur I-TASSER.

La faiblesse de tous les modèles construits et présentés dans la Figure 51 est la position du domaine C2 par rapport au cœur catalytique pour laquelle aucun consensus n'existe parmi les différents modèles. De son côté le cœur catalytique est globalement structuré de la même façon et de fait le même homologue sert à calculer tous ces domaines.

L'homologue choisi par les serveurs est la structure PDB 1F0I de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF.

Ainsi, afin de ne pas influencer la modélisation et augmenter le score des modèles, nous avons choisi de modéliser sans le domaine C2 dont la structure d'homologues proches existe déjà chez d'autres protéines. Ainsi les modèles construits à partir de la structure de la PLD de *S. sp* PMF auront un taux d'homologie plus élevé et seront donc plus fiables.

Avec le serveur Phyre2, les trois premiers homologues sélectionnés sont :

- 1) la structure de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF ;
- 2) la structure de la phosphatidylsérine synthase de *Haemophilus influenzae* ;
- 3) la structure de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF avec le dibutyrylphosphatidylcholine.

Pour le dernier modèle, seule une portion de la séquence en N-terminal est modélisée et de fait, il s'agit de celle avec le plus important pourcentage d'identité (22 %) tandis que le premier homologue a 18 % d'identité et le second en a 17 %. Sur les vingt modèles proposés par le serveur, la plus forte identité (29 %) est obtenue avec le domaine C-terminal de la polyphosphate kinase mais seulement 80 résidus sont alignés et modélisés.

Avec le serveur I-TASSER, les trois premiers homologues sélectionnés sont :

- 1) la structure de la PLD de *Streptomyces antibioticus* cristallisée avec la PC ;
- 2) la structure de la phosphatidylsérine synthase de *Haemophilus influenzae* ;
- 3) la structure de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF.

Dans les deux cas, pour chaque serveur, les taux d'identités sont trop faibles pour déterminer un homologue dans la PDB susceptible de constituer un bon point de départ pour la modélisation moléculaire.

Pour affiner les taux d'identité nous avons essayé de modéliser avec le serveur Phyre2 chaque lobe de l'*At*PLD indépendamment l'un de l'autre. Les homologues alors choisis sont les mêmes que précédemment avec des taux d'identité, certes plus importants, mais toujours en dessous des 30 %.

Ainsi, typiquement, un modèle construit par homologie avec une protéine qui comporte moins de 30 % d'identité de séquence ne peut être fiable. Cependant, on tire la fiabilité relative de nos modèles du fait que ces deux enzymes ont la même fonction catalytique.

3.1.2.3.4. Proposition d'un modèle 3D de l'*At*PLD

« Tous les modèles sont faux, mais certains sont utiles. » Georges Box

Les modèles obtenus sont assez fidèles à notre postulat de départ sur la topologie générale de chaque lobe de la PLD (Figure 52A et B). Ainsi, le lobe du côté N-terminal présente une topologie de type : α - β - α - β - α - β - α - β - β - α - β - α - β . À la différence de ce que nous avons prédit (Figure 50 et Figure 51), deux petites hélices α supplémentaires ont été modélisées, l'une à la place du premier brin et l'autre entre deux brins en fin de séquence.

Le lobe du côté C-terminal présente une topologie de type : α - β - α - β - α - β - β - β - α - α . À l'inverse du précédent, le lobe côté C-terminal est modélisé sans les deux brins β initiaux ni le brin β terminal.

Les différences que l'on observe entre notre prédiction et les modèles calculés sont dus aux critères que nous avons établis en 3.1.2.3.2. *Analyse de la structure secondaire*, nous avons négligé les hélices et les brins de moins de quatre résidus et les structures secondaires non alignées.

Notons que l'hélice α supplémentaire au milieu des quatre brins β dans le lobe côté N-terminal n'existant pas dans notre prédiction de structure, il est étonnant de la trouver ici. À l'inverse, l'hélice α supplémentaire en fin de séquence du lobe côté C-terminal existe bel et bien dans notre alignement de structures secondaires (Figure 49). De façon plus générale il semble que les serveurs de modélisations n'arrivent pas ou peu à modéliser les extrémités de cette protéine. On explique ainsi les différences présentes aux extrémités par rapport à nos modèles.

Le modèle calculé de la PLD entière sans domaine C2 (Figure 52C) indique un repliement globalement très proche de ce que l'on peut observer lobe par lobe (Figure 52A et B). Ce modèle est peu fiable et, comme précédemment, il génère d'autres structures secondaires non prédites précédemment. Ceci est dû à un taux d'identité faible avec l'homologue. Il faut ajouter à cela que les boucles modélisées sont très peu fiables. Il y a tout lieu de penser que ce sont la taille des boucles de la PLD végétales, plus importantes que celles de la PLD bactérienne, qui abaissent le taux d'identité avec l'homologue.

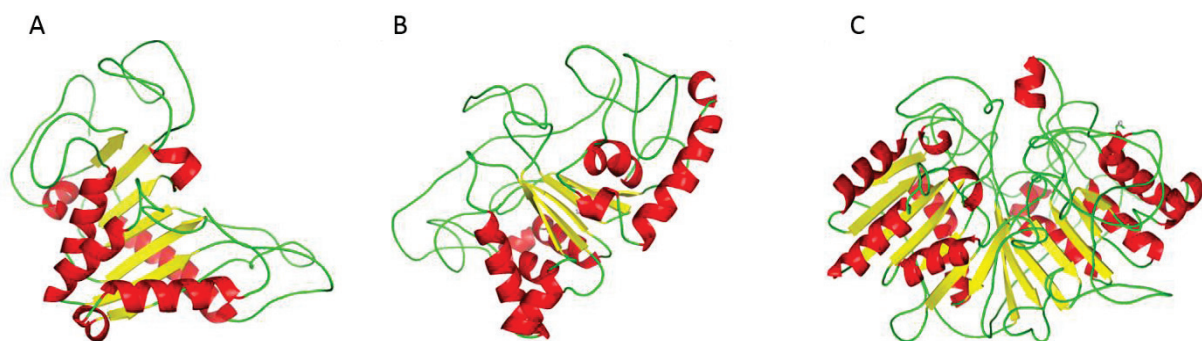


Figure 52 : Modèles de l'*AtPLD* α sans son domaine C2.

A) Modèle du lobe Nt. B) Modèle du lobe Ct. C) Modèle de la PLD entière sans le domaine C2. Les structures sont représentées avec des boucles simplifiées en vert, les hélices α sont en rouge et les brins β sont en jaune.

Cette topologie s'organise autour des six brins β qui forment un feuillet β central avec trois hélices α d'un côté dans le même sens que les brins β et la quatrième de l'autre côté perpendiculaire au feuillet (Figure 53).

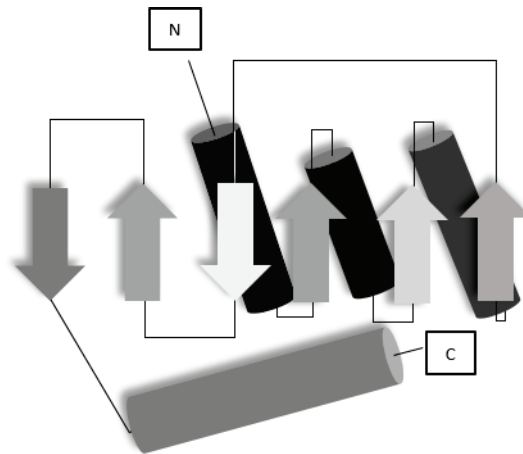


Figure 53 : Proposition de repliement général d'un des deux lobes du cœur catalytique des PLD. Les flèches représentent les brins β , les cylindres représentent les hélices α . N : extrémité amino-terminale. C : extrémité carboxy-terminale.

3.1.2.3.5. Conclusions & perspectives

Cette étude *in silico* nous permet de conclure que les PLD bactériennes et végétales possèdent un repliement commun. À partir des quatre domaines décrits (Ponting and Kerr, 1996), nous avons pu associer des structures secondaires conservées. Ceci nous permet aussi d'élargir notre analyse en constatant le fait que ces domaines existent aussi dans la PLD humaine. Nous postulons donc ici qu'il y aurait un repliement commun aux lobes constituant le cœur catalytique de toutes les PLD du vivant. Ce repliement suivrait cette topologie :

$$\alpha - \beta - \alpha - \beta - \alpha - \beta - \beta - \beta - \alpha.$$

Nous ne postulons pas sur les structures secondaires en amont ou en aval de ce repliement car nos modèles et prédictions ne s'accordent pas.

Nous pouvons aussi conclure sur le fait que toutes les PLD du vivant sont organisées en deux lobes se faisant face en miroir l'un à l'autre et avec un repliement commun. Comme décrit dans la structure de la PLD de *Streptomyces sp.* PMF, les motifs HKD constituant la poche catalytique se retrouvent dans le creux de la structure formée par les deux lobes dont la forme globale s'apparente à une selle de cheval.

Ainsi, il est possible de localiser de façon relative les mutants effectués au cours de la première partie de ce chapitre (Figure 54).

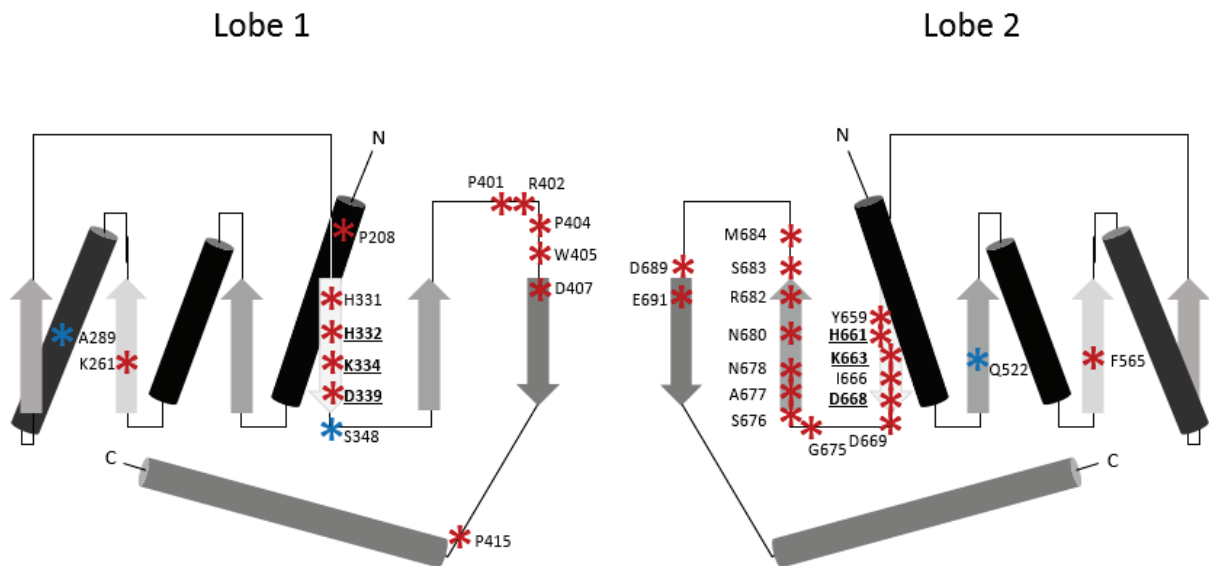


Figure 54 : Position relative des mutants de l'AtPLD dans un modèle topologique du repliement 3D de l'enzyme.

Les mutants sont représentés par des étoiles rouges. Les étoiles bleues représentent les mutants qui n'affectent pas l'activité catalytique de l'enzyme.

On note que la majorité des mutants effectués sont localisées au niveau des structures secondaires conservées. Nous n'avons pas souhaité représenter la boucle reliant les deux motifs car aucune information n'émerge de nos modèles (Figure 52). De la même façon, les structures secondaires ne sont pas représentées à l'échelle car des divergences apparaissent entre le début et la fin des structures secondaires selon les données de prédiction à partir de la séquence (Figure 49) et la modélisation 3D (Figure 52).

À l'heure actuelle, nous sommes limités par le peu d'homologues des PLD dont la structure existe, ce qui nous empêche de construire des modèles fiables. Ici, nous avons postulé à partir de la structure bilobée d'un repliement commun entre les lobes, ce qui nous a permis de limiter la taille des séquences à modéliser en modélisant chaque lobe de façon indépendante.

Nous ne sommes pour autant pas en capacité de positionner les domaines régulateurs des PLD. En effet si notre étude postule un repliement général des PLD du vivant, la différence entre toutes ces enzymes réside principalement dans les domaines régulateurs. Il s'agit chez les PLD végétales du domaine C2 responsable de la fixation du Ca^{2+} et des domaines PX et PH pour les PLD de mammifères responsables de la fixation de petites protéines G et de phosphoinositides.

Ces domaines situés à part du cœur catalytique sur lequel nous avons travaillé ont, pour certains, une structure 3D déjà identifiée. En réalité c'est la position de ces domaines régulateurs par rapport au cœur catalytique qui demeure un mystère. Notre étude de SAXS (cf. 3.1.2.2.5. Analyse structurale par SAXS et modèle à basse résolution) cherchait à identifier cette position en observant un mouvement de domaine entre la forme protéique active avec Ca^{2+} et inactive sans Ca^{2+} . Ceci aurait pu nous indiquer la position du domaine C2.

De même, notre étude cristallographique avait pour but de donner une structure aux PLD eucaryotes. L'un des espoirs pour déterminer la structure de ces enzymes réside dans la microscopie électronique. Aujourd'hui des structures à l'échelle atomiques peuvent être résolues grâce à cette technique qui ne demande pas de cristaux et qui est plus résolutive que le SAXS. Cependant, ceci n'est valable que pour les gros complexes protéiques entre 150 et 200 kDa minimum. On peut penser qu'il est plus probable d'obtenir la structure de la PLD humaine (120 kDa) par cette technique ; mais devant les difficultés d'accumuler cette enzyme particulière (Brown et al., 2007), il semble à ce jour que le plus efficace reste notre stratégie d'utiliser la PLD végétale, seule PLD eucaryote purifiée à homogénéité, comme outil pour obtenir la structure des PLD eucaryotes par cristallographie.

**3.2. Chapitre 2 : Domaine catalytique minimal,
maturation post-traductionnelle et inhibition de
la PLD**

Dans les travaux présentés dans le chapitre précédent, nous étudions la PLD végétale avec un prisme structural, nous avons pu déterminer un modèle de structure 3D et fonctionnel, nous avons souligné également l'importance des résidus conservés dans les PLD du vivant. Nous nous intéresserons dans ce chapitre à la définition du domaine catalytique minimal dans cette famille d'enzymes. De fait, comme nous l'avons développé en introduction (cf. 1.3.3.3. Mécanisme catalytique des PLD), le mécanisme catalytique de l'enzyme est le même pour l'activité d'hydrolyse et l'activité de transphosphatidylation ; seule l'origine du groupement hydroxyle responsable de la seconde attaque nucléophile varie (H_2O pour l'hydrolyse ou alcool primaire pour la transphosphatidylation). Pour cela, les expériences suivantes sont toujours réalisées avec le modèle de la PLD d'*A. thaliana* exprimée dans la levure *P. pastoris* et l'activité d'hydrolyse de la phosphatidylcholine est mesurée.

Nous déterminerons le domaine catalytique minimal nécessaire à l'activité hydrolase de la PLD chez les plantes pour ensuite s'intéresser à l'importance du domaine C2 et à sa régulation post-traductionnelle. Enfin, nous essayerons de bloquer cette activité hydrolase avec un inhibiteur spécifique que nous avons criblé à partir d'une chimiothèque.

3.2.1. Le domaine catalytique minimal de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*

3.2.1.1. De l'utilité d'exprimer le domaine minimum d'une enzyme

Étudier le domaine minimum d'une enzyme revient à chercher à définir la plus courte portion de séquence pour laquelle l'enzyme conserve son activité catalytique. Cela revient aussi à définir quelle portion est « accessoire » à l'enzyme pour catalyser sa réaction ou quelle portion est moins conservée et donc moins impliquée dans la catalyse.

Le domaine C2 est le domaine régulateur des PLD végétales. Cette portion de séquence caractéristique de la majorité des isoformes de PLD végétales (à l'exception des PLD ζ qui ont les domaines PX et PH comme les PLD de mammifères) est responsable de l'adsorption aux membranes lipidiques et de la fixation du Ca^{2+} , cofacteur indispensable à l'activité enzymatique. Découvert chez la protéine kinase C (Nishizuka, 1988), c'est par ce domaine que l'on suppose l'interaction de l'enzyme avec le substrat et que sont modélisés les CBR (pour *calcium binding region*) au nombre de 3 (Figure 55) (Rahier et al., 2016a).

La séquence consensus établie à partir de 209 séquences de PLD végétales (Figure 23) nous indique l'état de conservation tout au long de la séquence protéique. Nous notons au cours du chapitre 1 que la zone la moins conservée en termes de longueur et d'occurrence des résidus est en N-terminal. Étonnamment, c'est aussi dans cette zone que s'effectue un clivage de l'enzyme décrit dans la littérature et développé dans la seconde partie de ce chapitre. Ce clivage donne lieu à une protéine réduite de 35 résidus. Or cette protéine active n'est ni plus ni moins qu'un domaine minimum. À la différence des données de la littérature où la protéine est exprimée sous forme entière et se trouve clivée au cours de sa maturation, nous exprimerons ici, entre autres, l'enzyme directement tronquée des 35 premiers résidus.

On note que le domaine minimum de la PLD humaine a été étudié et les auteurs ont montré que les domaines régulateurs PX et PH ne sont pas nécessaires à l'activité basale de la PLD1 ou de la PLD2, seulement, ceux-ci permettent une augmentation significative de l'activité basale (jusqu'à soixante fois plus) par la fixation de protéines partenaires, comme la PKC ou des petites protéines G (Sung et al., 1999b, 1999a).

Une seule expérience s'approchant de la construction d'un domaine minimum dans une PLD végétale dans la littérature a été effectuée en 1994. La PLD de ricin est une enzyme clivée quand elle est purifiée *in planta*, pour l'expression dans *E. coli* les auteurs construisent une enzyme recombinante sans propeptide mais avec une protéine de fusion à la place. Ils n'observent pas d'activité que ce soit avec ou sans la protéine de fusion clivée par la thrombine (Wang et al., 1994). Ainsi, ils postulent que le peptide aide au repliement et protège la protéine de la dégradation. Nous testerons donc cette hypothèse en exprimant la protéine sans propeptide ni étiquette de purification.

Par la suite, en effectuant des réductions successives du domaine régulateur C2 nous testons une modification de l'affinité de l'enzyme pour les ions calcium et ainsi nous pouvons postuler sur une potentielle hiérarchie des trois CBR.

L'étude des domaines minimums de l'enzyme peut nous permettre, à terme, de porter nos travaux sur une enzyme plus courte et donc potentiellement plus stable et plus facile à exprimer dans un système d'expression comme *E. coli*, une enzyme moins susceptible de se retrouver dans les corps d'inclusions et donc plus facile à purifier, la purification en grande quantité à homogénéité nous permettant alors d'envisager une étude structurale.

Au terme de ces travaux nous pourrions discuter de la partie « accessoire » à l'activité catalytique et proposer un rôle qui justifie la conservation de cette partie chez les PLD végétales au cours de l'évolution.

3.2.1.2. Rationalité des domaines construits

L'expression des domaines minimums suit une logique basée sur des considérations structurales du domaines C2 établit par des travaux de thèse récents dans notre laboratoire (Rahier et al., 2016a).

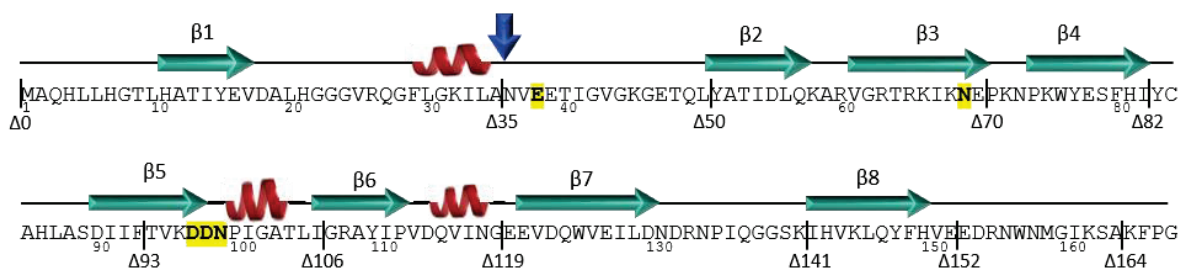


Figure 55 : Séquence peptidique du domaine C2 de la PLD d'*A. thaliana* et représentation schématique des structures secondaires (Rahier et al., 2016a).

Les résidus impliqués dans la fixation du Ca²⁺ sont surlignés en jaune et constituent les CBR. Les flèches vertes représentent les brins β et les hélices rouges les hélices α. Les barres verticales noires indiquent les positions où commencent les domaines minimums étudiés. La flèche verticale bleue indique la position du clivage retrouvée dans la protéine recombinante après purification.

Les domaines minimums sont tous construits par PCR dans les sites de restriction *SacII* et *NotI* du plasmide pGAPZB (cf. 2.1.3.7.2. Clonage des domaines minimum). Ainsi, nous avons construit également le contrôle approprié de la PLD de type sauvage clonée dans ces sites de restriction : nous l'appelons NΔ0 (qui ne diffère de la construction wt que par les sites de clonage).

Comme expliqué précédemment, nous voulons exprimer l'enzyme sans son « propeptide », cette séquence que l'on ne retrouve plus dans la PLD purifiée à partir de la plante, laissant penser que la PLD est clivée au cours de sa maturation. Pour la PLD d'*A. thaliana*, ce clivage élimine les 35 premiers résidus ; nous construisons donc le NΔ35.

Ces domaines minimums construits en N-terminal de la protéine sont donc des délétions successives du domaine C2 (Figure 55). Parmi les domaines minimums construits, le NΔ50 exprime une protéine sans CBR1, le NΔ70 exprime une protéine sans CBR2. Le NΔ82 est sans le brin β4, le NΔ93 est sans le brin β5, le NΔ106 est sans le CBR3 ni l'hélice α en aval de celui-ci, le NΔ119 est sans le brin β6 ni l'hélice α en aval, le NΔ141 est sans le β7. Enfin le NΔ152

exprime une protéine sans domaine C2 et le NΔ164 est sans domaine C2 ni jonction non structurée de celui-ci à la protéine (Figure 56).

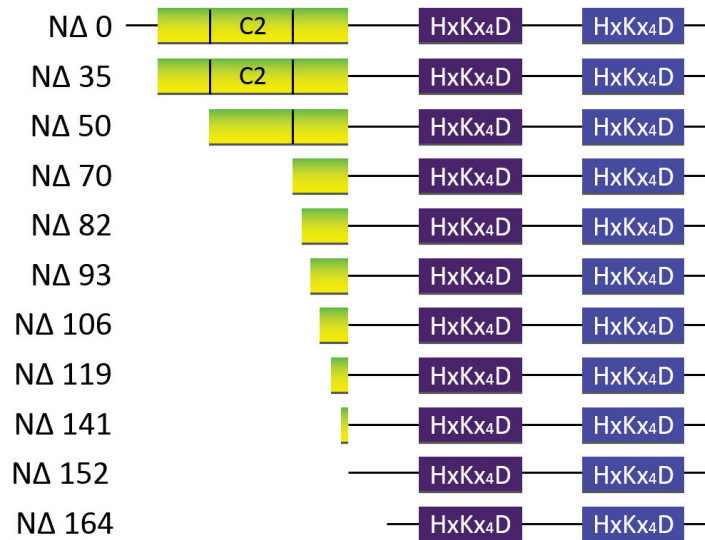


Figure 56 : Représentation schématique des domaines minimums d'*AtPLD* construits par délétions successives de l'extrémité N-terminale.

3.2.1.3. Construction des domaines minimums de la PLD par PCR

L'ensemble des étapes de clonage est présenté en Figure 57.

Les constructions *AtPLD* NΔ70 et *AtPLD* NΔ164 ont été obtenues avec les amorces 243 et 246 respectivement, et l'antisens 97 qui permettent d'amplifier le gène codant l'*AtPLD* réduit de 210 et 492 paires de bases en 5', avec la Q5[®] High Fidelity polymerase. Les constructions *AtPLD* NΔ82, NΔ93, NΔ106, NΔ119 et NΔ141 sont construites différemment. Le gène codant l'*AtPLD* est amplifié, réduit respectivement de 243, 279, 318, 357 et 423 paires de bases avec la *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (cf. 2.1.3.6. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)) et les amorces sens 405, 406, 407, 408 et 409 respectivement, et l'amorce antisens 97.

Les produits de PCR sont purifiés par le kit QIAquick de Qiagen puis incubés avec la *Taq polymerase* et les dNTP pour ajouter un nucléotide adénosine monophosphate aux extrémités 3' (cf. 2.1.3.6. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)). Les produits de PCR sont ensuite reliqués dans le vecteur pGM[®]-T Easy (Promega) puis transformés dans les cellules JM109 d'*E. coli*. Les colonies blanches (Figure 19) sont testées par PCR pour l'insertion du gène dans le vecteur avec les amorces T7 et SP6. Les plasmides sont alors extraits, purifiés puis séquencés (Figure 57A et B)

Pour obtenir les domaines minimum N Δ 0, N Δ 35, N Δ 50 et N Δ 152, un fragment plus court est amplifié par PCR en utilisant les amorces 241, 242, 243 et 245 respectivement, et l'amorce antisens 102, ou 387 pour le N Δ 152. Les produits de PCR sont purifiés puis clonés comme décrit précédemment dans le vecteur pGM[®]-T Easy. Les plasmides sont alors extraits, purifiés puis séquencés (Figure 57C)

Pour les domaines N Δ 0, N Δ 35 et N Δ 50, on peut extraire un fragment avec les enzymes de restriction SacII et BclI et le sous-cloner avec les mêmes enzymes dans le plasmide pGM[®]-T Easy contenant l'*At*PLD N Δ 70. Cependant, l'enzyme BclI est sensible à la méthylation effectuée par une méthylase qui catalyse l'addition d'un groupement méthyle sur l'adénine d'une séquence 5'-GATC-3'. La souche JM109 dans laquelle sont produites les constructions dans le plasmide pGM[®]-T Easy possède le gène *dam* codant la *DNA adenine methylase* ou *DNA adenine methyltransferase* et méthyle donc les plasmides sur ce type de séquence (cf.). Ainsi il n'est pas possible de couper avec l'enzyme BclI l'ADN plasmidique produit dans cette souche. Pour pouvoir effectuer ce sous-clonage nous transformons les constructions contenues dans le plasmide pGM[®]-T Easy dans la souche GM48 d'*E. coli* (Figure 57D) qui est *dam-3*, c'est-à-dire mutée sur ce gène (cf. 2.1.1.1.4. *Escherichia coli* GM48). Après purification du plasmide nous pouvons effectuer le sous-clonage et construire les domaines minimums N Δ 0, N Δ 35 et N Δ 50 à partir du N Δ 70.

Pour le domaine minimum N Δ 152, on peut extraire le fragment avec les enzymes de restrictions SacII et XhoI et le sous-cloner avec les mêmes enzymes dans le plasmide pGM[®]-T Easy contenant l'*At*PLD N Δ 164.

Toutes les constructions possèdent un site de restriction *SacII* en 5' et *NotI* en 3'. Une fois obtenues dans le plasmide pGM[®]-T Easy et séquencées par les amorces situées sur les promoteurs T7 et SP6 (Tableau 3) elles sont finalement transférées dans le vecteur d'expression de la levure *P. pastoris* pGAPZB avec les enzymes de restrictions SacII et NotI (Figure 57E). Avant transformation les plasmides sont séquencés avec les amorces 29, 113 et 55.

Nous criblons donc l'activité enzymatique des domaines minimums N-terminaux de l'*At*PLD par délétion progressive du domaine C2.

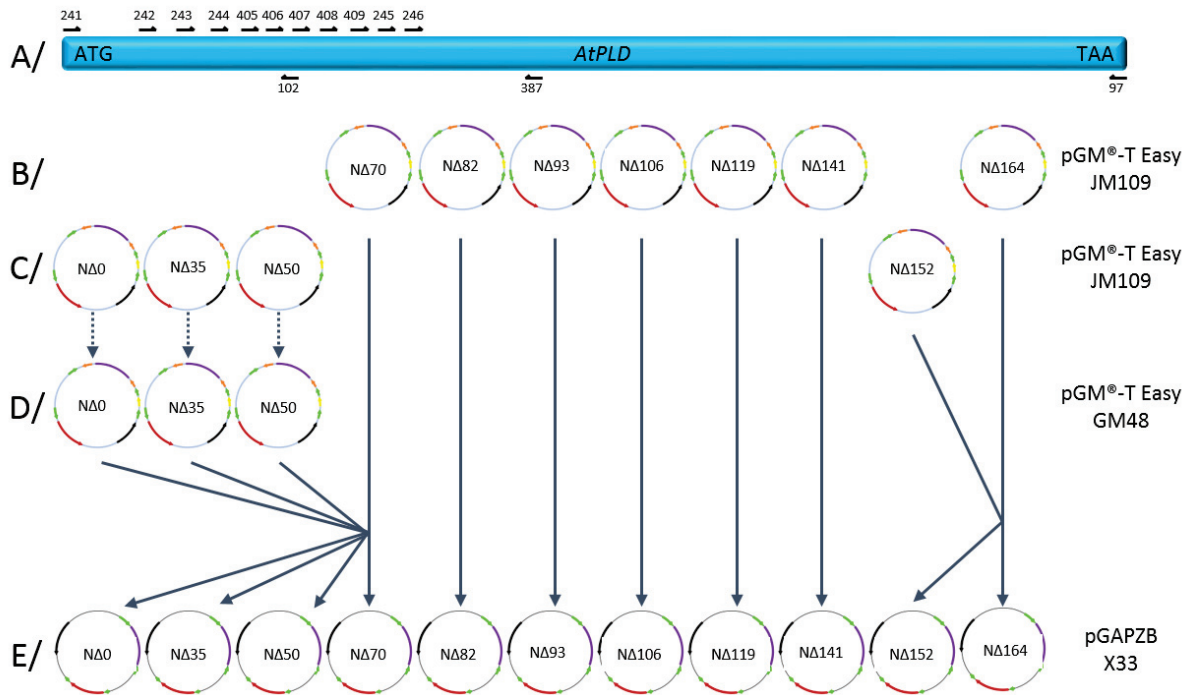


Figure 57 : Représentation schématique de la construction des domaines minimums de l'*AtPLD*
 A) Schéma de la position relative des amorces de PCR sur le gène codant l'*AtPLD*. B) Les domaines minimums NΔ70, 82, 93, 106, 119, 141 et 164 sont construits dans le pGM[®]-T Easy. C) Les domaines minimums NΔ0, 35, 50 et 152 sont construits dans le pGM[®]-T Easy sous forme de fragment. D) Les NΔ0, 35 et 50 sont transformés dans la souche d'*E. coli* GM48 pour ensuite utiliser l'enzyme BclI sensible aux méthylation. E) Les constructions sont digérées avec SacII et NotI puis transférées dans le plasmide pGAPZB, les domaines NΔ0, 35 et 50 sont d'abord transférés dans le pGM[®]-T Easy-NΔ70 avec les enzymes SacII/BclI, puis dans le pGAPZB (SacII/NotI), le domaine NΔ152 est d'abord transféré dans le pGM[®]-T Easy-NΔ164 avec les enzymes SacII/XhoI, puis dans le pGAPZB (SacII/NotI).

3.2.1.4. Activité catalytique des domaines minimums et expression

Dans un premier temps nous testons l'activité d'hydrolyse des domaines minimums (Figure 58A). Le témoin positif NΔ0 est actif et possède une activité voisine du wt utilisé lors du chapitre précédent. A l'exception du NΔ70 dont le cas sera discuté par la suite, il n'apparaît qu'aucun domaine minimum ne catalyse l'hydrolyse de la PC dans les conditions standards du test (Figure 58A) (cf. 2.2.4.1. Test chromogénique). Il semble à ce stade que l'intégrité de l'enzyme est nécessaire à l'activité enzymatique de la PLD ou bien qu'une portion N-terminale de celle-ci est déterminante au repliement et à l'expression active.

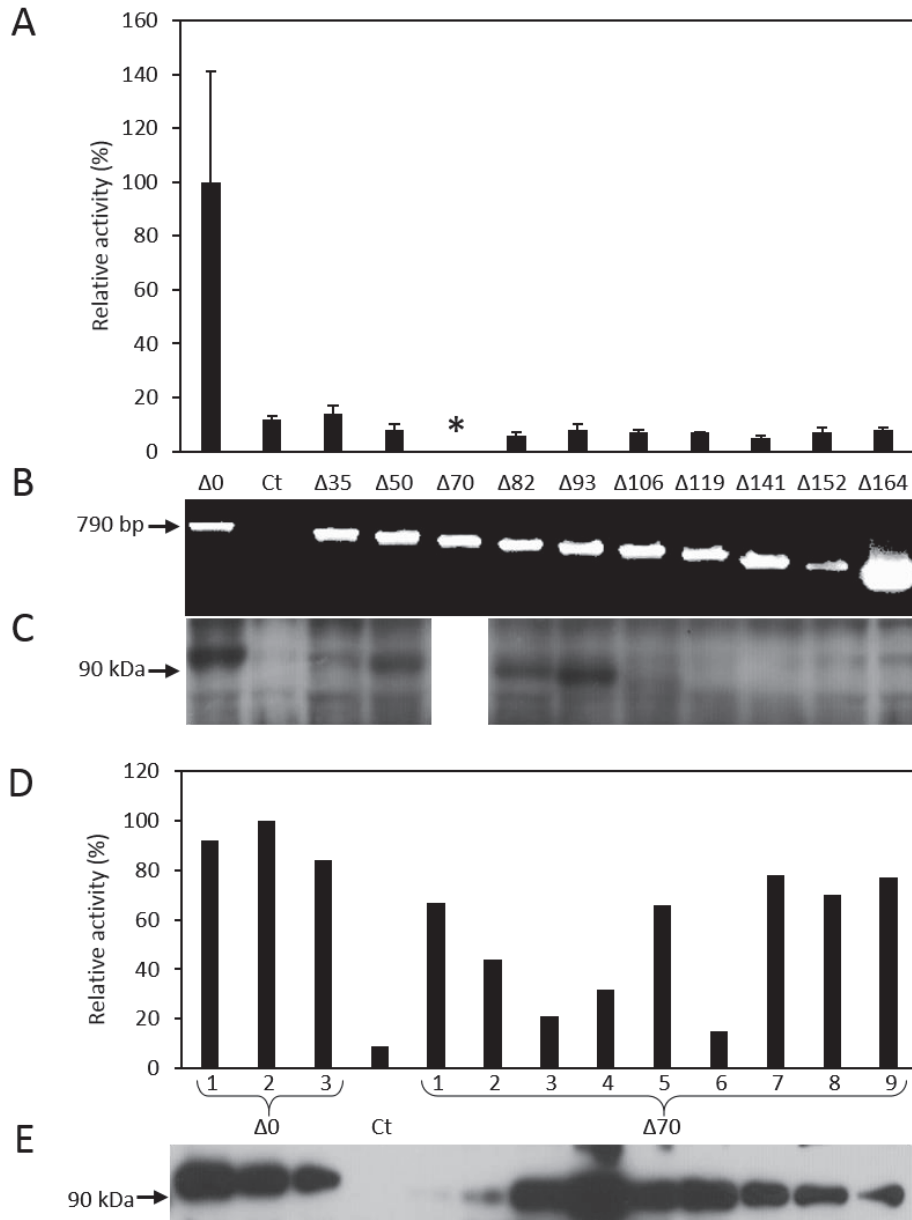


Figure 58 : Activité enzymatique totale rapporté à 100 % du N Δ 0 et expression des domaines minimums dans la levure *P. pastoris*.

A) Activité enzymatique totale mesurée sur un extrait brut de protéines solubles de *P. pastoris* exprimant les différents domaines minimums et le vecteur vide (Ct). Les activités sont calculées par rapport au N Δ 0 rapporté à 100 %, les valeurs indiquées sont les moyennes \pm écart-type sur trois clones indépendants ($p < 0,05$ pour toutes les constructions comparées au N Δ 0). L'astérisque indique que les données sont présentées en D. B) Révélation par immunoempreinte après SDS-PAGE avec un anticorps anti-domaine C2 de la PLD d'*A. thaliana*. C) Validation de l'insertion du transgène *AtPLD α* dans le génome des clones recombinants. Après extraction de l'ADN, une PCR est effectuée avec une amorce sens située sur le promoteur et une amorce antisens situées sur la PLD 790 pb en aval de la fin de la séquence codant le domaine C2. D) Activité totale mesurée en singulet sur un extrait brut de protéines solubles de *P. pastoris* exprimant le domaines minimal N Δ 0, N Δ 70 ou bien le vecteur vide (Ct). Les valeurs sont calculées par rapport au clone n°2 N Δ 0 rapporté à 100 %. E) Révélation par immunoempreinte après SDS-PAGE avec un anticorps anti-domaine C2 de la PLD d'*A. thaliana*.

L'analyse de l'expression par immunoempreinte montre que les domaines minimums sont exprimés dans la levure *P. pastoris* témoignant ici qu'il n'existe pas de problème de repliement ou de dégradation de l'enzyme au cours de sa synthèse (Figure 58B) comme nous avons pu l'observer avec certains mutants instables du chapitre précédent. L'anticorps que nous utilisons est dirigé contre le domaine C2 de l'enzyme, or nous ciblons des PLD avec des domaines C2 raccourcis ou absents (NΔ152 et NΔ164). Ainsi, l'absence de protéines exprimées pour les domaines minimums les plus courts s'explique par la réduction de la taille de l'épitope détecté par l'anticorps.

3.2.1.5. Le cas du NΔ70

Les résultats de la protéine tronquée NΔ70 sont traités à part. De fait, c'est le seul domaine minimum pour lequel les résultats sont :

- hétérogènes : on note des niveaux d'activité très différents d'un clone à l'autre ;
- difficilement reproductibles : l'activité enzymatique n'est pas toujours détectable à un même niveau, d'une expérience à l'autre, dans les clones exprimant cette protéine.

Ainsi, on note dans la Figure 58D après études de neuf clones, une activité enzymatique disparate, avec des clones ayant une activité voisine du wt et d'autres voisine du Ct. Ces différences de niveaux d'activité, labiles par ailleurs, ne sont pour l'instant pas expliquées. Cependant, dans tous les clones testés la protéine est détectable à la taille attendue en révélant par immunoempreinte (Figure 58D) indiquant qu'il n'y a pas ici de problème de repliement de la protéine entraînant sa dégradation. Ainsi, le NΔ70 est une construction qui possède indéniablement de l'activité enzymatique mais contrairement au contrôle ou au wt celle-ci est variable et hétérogène d'un clone à l'autre.

3.2.1.6. Discussion

Aucune étude du domaine catalytique minimal de la PLD végétale n'existe dans la littérature si ce n'est l'expression de la PLD de ricin sans propeptide mais avec une protéine de fusion à la place. Aucune activité PLD n'est alors détectée avec l'expression de cette construction (Wang et al., 1994). À l'inverse, la réduction en N-terminale de la PLD humaine n'entraîne pas de perte d'activité mais réduit la capacité de l'enzyme à interagir avec ses partenaires (Sung et al., 1999b, 1999a). Notons par ailleurs que la délétion d'un fragment C-terminal des PLD entraîne l'abolition totale de l'activité enzymatique que ce soit sur la PLD humaine (Sung et al., 1999a) ou végétale (Lerchner et al., 2006).

Notre étude de réduction successive des domaines C2 N-terminal de la PLD d'*A. thaliana* nous permet de penser que le propeptide est, comme le postule les auteurs de cette étude, impliqué dans le repliement de l'enzyme ou du moins dans son activité catalytique. Cependant, comme nous le montrons au cours de notre étude structurale au chapitre 1, il semble y avoir une réelle dichotomie entre le domaine régulateur et le cœur catalytique bilobé de l'enzyme. Ces deux parties sont deux modules structurellement indépendants. Or, nos résultats ci-dessus indiquent que les extrémités des domaines C2 (partie N-terminal et C-terminale) sont indispensables à l'activité catalytique de la PLD, néanmoins, la délétion de 70 résidus (NΔ70) ne semble pas nuire à la capacité catalytique de l'enzyme.

Alors que les PLD procaryotes comme les PLD bactériennes semblent s'affranchir de domaines régulateurs particuliers (Figure 8), il semble ici, à travers la PLD d'*A. thaliana*, que les PLD végétales nécessitent la présence de ce domaine régulateur et qu'elles ne possèdent pas ou plus de cœur catalytique actif autonome.

3.2.1.7. Conclusions & perspectives

Dans les conditions dans lesquelles nous testons l'activité PLD des domaines minimums, nous ne détectons pas d'activité enzymatique, sauf pour NΔ70. L'expression des domaines minimums dans *P. pastoris* indique qu'ils sont tous exprimés, à l'exception de ceux, trop courts, que nous ne pouvons pas détecter à cause de la spécificité restreinte de l'anticorps utilisé. En effet celui-ci cible le domaine C2 de la PLD, or c'est ce domaine qui est successivement réduit pour exprimer différents domaines minimums.

Pour le cas du NΔ70, la présence d'activité catalytique même variable d'un clone à l'autre semble indiquer que les structures secondaires en amont, soit les trois premiers brins β et les CBR1 et 2 ne sont pas indispensables. Il apparaît en tout cas que la protéine est fortement instable car sur l'ensemble de ces travaux il s'agit de la seule construction présentant une telle hétérogénéité de résultats.

Dans l'hypothèse où le propeptide servirait à l'adressage de l'enzyme pour sa synthèse, son repliement ou son activité, ceci expliquerait que nous ne voyions pas d'activité pour les domaines minimums (même si on détecte de l'activité pour le NΔ70), aucun d'entre eux ne possédant le propeptide. Pour tester comme il était initialement prévu, la capacité catalytique de la PLD en fonction du nombre de CBR du domaine C2 et en s'affranchissant du problème

du propeptide, il faudrait exprimer ces domaines minimums fusionnés avec le propeptide en lieu et place de la partie tronquée (Figure 59).

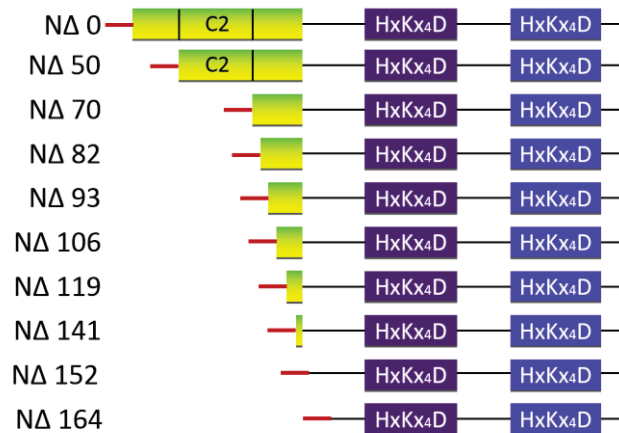


Figure 59 : Proposition d'étude des domaines minimums de la PLD végétale. Le propeptide (en rouge) est fusionné en N-terminal de chaque domaine minimum de façon à favoriser l'expression de la protéine tronquée.

3.2.2. Étude de la partie amino-terminale de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*

Alors que nous avons montré l'importance du propeptide et de l'intégralité du domaine C2 dans l'activité catalytique, nous focalisons désormais nos travaux sur le clivage de ce propeptide constaté sur les PLD purifiées.

Les protéases ou peptidases sont une classe de protéines hydrolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques. On distingue principalement deux groupes : les endopeptidases qui clivent à l'intérieur d'un peptide une liaison peptidique entre deux résidus et les exopeptidases qui clivent l'extrémité N-terminale ou C-terminale d'un peptide. La classe des protéases est retrouvée dans tout le vivant et on en distingue quatre grandes catégories :

- les protéases à sérine (EC 3.4.21) qui possèdent un résidu sérinyl dans leur site catalytique au sein d'une triade Asp, His, Ser. La thrombine, la trypsine ou encore la chymotrypsine sont des protéases à sérine ;
- les protéases à cystéine (EC 3.4.22) qui possèdent un résidu cystéinyl dans leur site catalytique, comme la papaïne ou les caspases notamment impliquées dans l'apoptose ;
- les protéases aspartiques (EC 3.4.23) qui possèdent une aspartyl dans leur site actif comme la pepsine ;

- les métallo-protéases (EC 3.4.24) qui possèdent un ion métallique dans leur site actif (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), comme les protéases de la matrice extra-cellulaire ou la thermolysine (Mazorra-Manzano et al., 2017).

Toutes les protéases ont une spécificité vis-à-vis de leur substrat : certaines vont cibler une séquence spécifique là où d'autres vont cibler un résidu aux caractéristiques biochimiques particulières. L'action la plus commune des protéases est le clivage d'un zymogène (forme précurseur de la protéine inactive ou pro-protéine) rendant la protéine active.

En partant du principe que le clivage des 35 premiers résidus de l'*At*PLD est dû à l'action d'une protéase, nous chercherons à vérifier cette hypothèse et à déterminer la protéase responsable de ce clivage.

3.2.2.1. État de l'art

Le phénomène de clivage des premiers résidus de la PLD α végétale a été constaté à plusieurs reprises et les publications le rapportant sont compilées dans le Tableau 6. Pour autant, jamais ce phénomène n'a été exploré plus en détails.

Dès les années 1970, on note le clivage des PLD végétales avec l'identification comme résidu N-terminal de l'acide glutamique chez la PLD de coton (Mad'iarov, 1976) et de la glycine chez la PLD de cacahuète (Heller, 1978).

Abousalham et al. (Abousalham et al., 1993) et Wang et al. (Wang et al., 1993) sont pourtant les premiers à parler de clivage de la PLD purifiée chez le chou et le ricin respectivement en 1993. En 1994, Wang et al. (Wang et al., 1994) ont cloné la PLD de ricin sans propeptide mais avec une protéine de fusion à la place et n'observe dès lors plus aucune activité enzymatique (cf. 2.1.6). Ceci lui permet de postuler que le propeptide est impliqué dans le repliement de la protéine et la protégerait ainsi de la dégradation (Wang et al., 1994).

Pour autant, ce n'est qu'en clonant la PLD de riz et en observant le même phénomène que Ueki *et al.* (Ueki et al., 1995) postulent que ce peptide pourrait être un peptide signal, même s'ils admettent que le peptide en question n'en porte pas les caractéristiques.

Il est devenu commun de penser que ce clivage était une modification post-traductionnelle de façon à former une protéine mature. D'autres hypothèses demeurent en suspens : ce peptide servirait au transport protéique et/ou à l'ancrage dans une membrane (Sato et al., 2000), ou bien il pourrait s'agir d'un peptide d'adressage à la vacuole (Ben Ali et al., 2007). L'un des constats

les plus flagrants de ce phénomène est à attribuer à l'équipe d'Euclides Pires qui travaille sur l'interaction entre la cardosine A et la PLD α (Simões et al., 2005). Les chercheurs déterminent que la cardosine A, qui est une protéase aspartique, interagit avec le domaine C2 de la PLD α de cardon au niveau du motif RGE de la cardosine A. Ils observent un domaine C2 clivé en N-terminal lors de la disruption du complexe formé par les deux protéines.

D'autres auteurs trouvent plusieurs séquences tronquées possibles au sein d'une même purification de la PLD de *V. unguiculata* (El Maarouf et al., 2000), ou de la PLD de chou (Sato et al., 2000; Watanabe et al., 1999). Ceci semble indiquer un aspect relativement aspécifique de ce phénomène qui, de fait, demeure localisé dans une zone très peu conservée des PLD végétales (Figure 23) et dont les modèles de structure existants semblent indiquer que cette zone est exposée et donc sensible à l'action de protéases. Il est aussi tout à fait possible que le clivage ait alors lieu par une endoprotéase spécifique suivi d'une dégradation de l'extrémité N-terminale par d'autres exoprotéases aspécifiques.

Notons ici que des exceptions existent quant à ce clivage et que celui-ci semble spécifique par deux choses :

- le système d'expression bactérien *E. coli* ne semble pas produire de protéines clivées ;
- ce clivage est exclusivement observé sur des protéines purifiées en utilisant une chromatographie hydrophobe comme dernière étape et il est possible que cette technique sélectionne une isoforme (clivée) plutôt qu'une autre (non clivée) (Tableau 6).

Ici demeure un biais expérimental évident : toutes les protéines purifiées sur un autre type de colonne portent une étiquette (GST, 6xHis, FLAG) et la rétention spécifique nécessitant la présence de l'étiquette ne permet pas alors d'observer autre chose que la forme entière de la protéine (Kim et al. 1999; Lein and Saalbach, 2001; Moreno-Pérez et al., 2010; Whitaker et al., 2001).

Enfin, certains n'ont pas pu observer de clivage car la technique de séquençage est sensible à la modification du résidu N-terminal comme l'acétylation. C'est le cas pour certaines PLDs purifiées à partir du tissu végétal (Nakazawa et al., 2006; Novotna et al., 1999; Oblozinsky et al., 2003; Schöps et al., 2002).

Ajoutons que la séquence de la PLD α de moutarde (*Brassica juncea*) a été déterminée par spectrométrie de masse après digestion trypsique de la protéine purifiée (Khatoon et al., 2015).

Le peptide N-terminal portant la méthionine initiale, ou du moins les 35 à 40 premiers résidus, n'a pas été détecté ce qui pourrait signifier son clivage. Cependant, notons que la technique utilisée ne permet pas d'identifier le résidu N-terminal à proprement parler (Khatoon et al., 2015).

Enfin, nous ajoutons à ces données des résultats que nous avons obtenus au cours de la purification de la PLD de *V. unguiculata* exprimée dans *P. pastoris* et purifiée selon le protocole de Ben Ali *et al.* (Ben Ali et al., 2007). Dans des conditions de purification où nous avons utilisé une résine d'Octyl Sépharose® neuve, nous avons pu observer deux pics d'élution correspondant à deux pics de *Vu*PLD avec des activités enzymatiques identiques qui ont été analysés par SDS-PAGE (Figure 60). La détermination de la séquence N-terminal a indiqué que le premier pic (Fractions 1-7 Figure 60) est composé à 50 % de protéine clivée avec une séquence N-terminal QNIEE identique à celle publiée (Ben Ali et al., 2007) et à 50 % de protéine entière. Le second pic (Fractions 11-21 Figure 60) est quant à lui composé uniquement de protéine entière. Ainsi dans ces conditions expérimentales 75 % de la protéine exprimée n'est pas clivée (Figure 60).

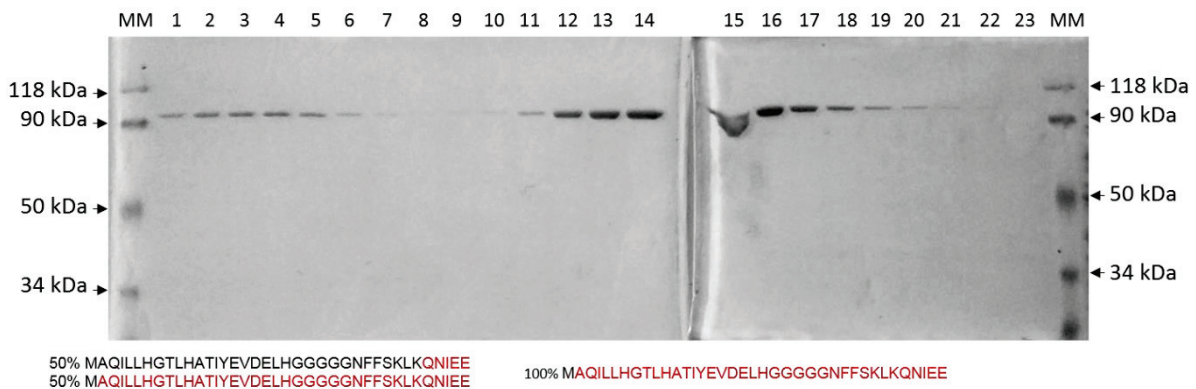


Figure 60 : Analyse par SDS-PAGE des fractions éluées de la purification la *Vu*PLD exprimée dans *P. pastoris* sur colonne d'Octyl Sépharose®.

MM : marqueur de masse moléculaire. kDa : kilodalton. Les séquences N-terminales obtenues sont indiquées en rouge sur la séquence théorique en noir et le taux de présence est indiqué en pourcentage.

Il demeure qu'à ce jour aucun rôle précis n'a été défini pour ce clivage et aucune caractérisation n'a été entreprise.

Tableau 6 : Liste des PLD α purifiées avec leur séquence N-terminale.

L'espace entre deux tirets indique une troncature de 26 résidus dans un but de présentation. Les séquences déterminées sont écrites en rouge ; OS : Octyl Sépharose®, PS : Phényl Sépharose, CH : colonne hydrophobe, sous-famille de Brassica oleracea : K* : Kinkei, K : Kinsyun, M : Matsunami.

Organisme	Type de Purification	Séquence	Source	Référence
<i>Brassica oleracea</i>	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>In vivo</i>	Abousalham et al. 1993
	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>In vivo</i>	Sato et al. 2000
	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>In vivo</i>	Sato et al. 2000
<i>Brassica oleracea</i> K*/K/M	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>In vivo</i>	Watanabe et al. 1999
<i>Brassica oleracea</i> K*/K/M	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>In vivo</i>	Watanabe et al. 1999
<i>Brassica oleracea</i> K*/K/M	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>In vivo</i>	Watanabe et al. 1999
<i>Brassica oleracea</i> K*	OS	MAQ- -GKILANVEETIGFGKGET	<i>In vivo</i>	Watanabe et al. 1999
<i>Brassica oleracea</i> K	OS	MAQ- -GKILANVEETIGFGKGET	<i>In vivo</i>	Watanabe et al. 1999
<i>Brassica juncea</i>	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>In vivo</i>	Khatoon et al, 2015
	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>E. coli</i>	Shäffner et al. 2002
<i>Ricinus communis</i>	CH	MAQ- -RKLVENIEETVGFVGKGV	<i>In vivo</i>	Wang et al. 1993
	CH	MAQ- -RKLVENIEETVGFVGKGV	<i>E. coli</i>	Wang et al. 1994
<i>Glycine max</i>	OS	MAQ- -SKLKQNFEEETVGIGKGV	<i>In vivo</i>	Abousalham et al. 1995
<i>Helianthus annuus</i>	OS	MAQ- -SKIVANIEETIGFGKGV	<i>In vivo</i>	Abousalham et al. 1997
<i>Vigna unguiculata</i>	OS	MAQ- -SKLKQNFEEETVGIGKGV	Sf9	El Maarouf et al. 2000
	OS	MAQ- -SKLKQNFEEETVGIGKGV	Sf9	El Maarouf et al. 2000
	OS	MAQ- -SKLKQNFEEETVGIGKGV	<i>P. pastoris</i>	Ben Ali et al. 2006
	OS	MAQ- -SKLKQNFEEETVGIGKGV	<i>P. pastoris</i>	Données du laboratoire
	OS	MAQ- -SKLKQNFEEETVGIGKGV	<i>P. pastoris</i>	Données du laboratoire
<i>Arabidopsis thaliana</i>	OS	MAQ- -GKILANVEETIGVGKGET	<i>P. pastoris</i>	Rahier et al. 2016
<i>Oryza sativa</i>	PS	MAQ- -RKFVEGIEDTVGVGKGV	<i>In vivo</i>	Ueki et al. 1995
<i>Zea mays</i>	PS	Non déterminée	<i>In vivo</i>	Ueki et al. 1995
<i>Papaver somniferum</i>	OS	N-term bloqué	<i>In vivo</i>	Oblozinsky et al. 2002
<i>Arachis hypogaea</i>	PS	N-term bloqué	<i>In vivo</i>	Nakazawa et al. 2006
<i>Brassica napus</i>	OS	N-term bloqué	<i>In vivo</i>	Novotna et al. 1999
<i>Brassica oleracea</i>	OS	N-term acétylé	<i>In vivo</i>	Shöps et al. 2002
<i>Helianthus annuus</i>	6xHis	Non clivée	<i>E. coli</i>	Moreno-Perez et al. 2009
<i>Nicotiana tabacum</i>	GST	Non clivée	<i>E. coli</i>	Lein & Saalbach 2000
<i>Brassica oleracea</i>	GST	Non clivée	<i>E. coli</i>	Kim et al. 1999
<i>Lycopersicon esculentum</i>	FLAG	Non clivée	<i>E. coli</i>	Whitaker et al. 2000

Les PLD sont ainsi étudiées directement à partir du tissu végétal ou bien clonées dans des organismes recombinants. L'organisme d'expression le plus courant demeure la bactérie *E. coli* et on rapporte l'expression de la PLD α végétale pour sept espèces :

- la PLD de ricin (*Ricinus communis*) est clonée dans un plasmide pBluescript SK(-) et exprimée dans la souche JM109 d'*E. coli*. Les auteurs détectent alors une activité enzymatique PLD de 18 nmol/min/mg dans un extrait brut de protéines solubles. Cette activité est clairement au dessus du témoin (cellules non induites) à 1 nmol/min/mg. L'enzyme n'est pas purifiée (Wang et al., 1994).
- la PLD de chou (*Brassica oleracea*) a été clonée fusionnée à une étiquette GST dans le plasmide pGEX4T-1 et exprimée dans les cellules JM109. Les auteurs détectent la protéine par immunoempreinte et l'activité PLD dans un lysat cellulaire en comparaison avec l'expression de la GST seule mais ne purifient pas l'enzyme (Kim et al., 1999).
- la PLD de tomate (*Lycopersicon esculentum*) est clonée dans un plasmide pFLAG-MAC et exprimée dans les cellules JM109 d'*E. coli*, et dans un plasmide pZL1 exprimé dans la souche DH10B(Zip) d'*E. coli*. Les auteurs détectent alors l'activité enzymatique en quantifiant le PA dans les cellules induites à l'IPTG. L'enzyme n'est pas purifiée (Whitaker et al., 2001).
- la PLD α de tabac (*Nicotiana tabacum*) a été clonée dans le plasmide pGEX-5X-1 et exprimée dans les cellules BL21 d'*E. coli*. La PLD est alors fusionnée à une étiquette GST en N-terminal et, une fois purifiée possède une activité spécifique de 8 μ mol de PC hydrolysé/min/ μ mol de protéine. Les auteurs montrent alors l'influence de la présence de la sous-unité α d'une protéine G sur l'activité enzymatique (Lein and Saalbach, 2001).
- les PLD 1 et 2 de chou (*Brassica oleracea*) sont clonées dans un plasmide pREST5a et exprimées dans la même souche que celle que nous utilisons : *E. coli* BL21 (DE3). Les auteurs détectent alors une activité enzymatique dans un extrait brut de protéines solubles. Il n'y a pas de témoins appropriés mais les auteurs purifient l'enzyme et font varier la température au cours du test enzymatique ainsi que la quantité d'ions calcium pour une enzyme capable d'effectuer l'hydrolyse de la PC et la transphosphatidylolation (Schäffner et al., 2002).
- la PLD α d'*A. thaliana* a été clonée dans le plasmide pEt28a et exprimée dans les cellules BL21 (DE3) d'*E. coli*. Les auteurs purifient l'enzyme et étudient son activité dans le cadre de l'interaction avec une protéine G (Zhao and Wang, 2004).

- les PLD α 1 et 2 de pavot (*Papaver somniferum*) ont été clonées dans le plasmide pEt28b et exprimées dans la souche XL1-blue d'*E. coli*. Les auteurs purifient les deux isoformes sur Octyl Sépharose[®] dans des quantités très faibles (70 μ g et 50 μ g pour les isoformes 1 et 2 respectivement) et avec une activité catalytique de 456 et 500 nmol/min/mg respectivement (Lerchner et al., 2005).
- la PLD α de tournesol (*Helianthus annuus*) est clonée dans un plasmide pGE-80L et exprimée dans la souche XL1-blue d'*E. coli*. Les auteurs détectent alors de l'activité enzymatique en observant le taux de PA dans les cellules induites à l'IPTG et *in vitro* avec la protéine purifiée (Moreno-Pérez et al., 2010).

On note que malgré les facilités d'expression et de purification qu'offre *E. coli*, les auteurs des études susnommées ne purifient pas de façon systématique l'enzyme, et les essais de purification amènent rarement à de grandes quantités d'enzymes pures témoignant peut-être ici de la difficulté d'exprimer les PLD recombinantes en système bactérien. C'est pourquoi nous choisissons de faire varier les systèmes d'expression pour étudier le phénomène de clivage de la PLD α d'*A. thaliana*.

3.2.2.2. Expression de l'*AtPLD* avec une étiquette 6xHis

Pour caractériser le phénomène de clivage nous modifions le gène codant l'*AtPLD* pour fusionner un peptide composé de six résidus histidyl en amino-terminal. Cette construction, effectuée par PCR avec l'amorce sens 222 et anti-sens 97 (cf. Tableau 3), sera exprimée dans trois organismes recombinants différents :

- la levure *P. pastoris*, système d'expression recombinant fructueux pour exprimer les PLD végétales (*VuPLD* et *AtPLD*) ;
- la levure *S. cerevisiae*, organisme dont des banques de mutants très complètes sont disponibles notamment au niveau des protéases ;
- la bactérie *E. coli* pour sa simplicité d'usage et sa capacité à exprimer de grandes quantités de protéines en vue d'une purification.

En effet, en caractérisant le clivage N-terminal des PLD végétales nous cherchons à identifier un site de clivage particulier que nous pourrions par la suite muter pour stabiliser et contrôler cette maturation. Ainsi nous offrons la possibilité de pouvoir purifier ces enzymes au moyen d'une étiquette en N-terminale. Ceci assurerait un niveau de pureté et une homogénéité encore jamais atteinte pour la PLD d'*A. thaliana*.

3.2.2.2.1. Clonage dans *E. coli*, *S. cerevisiae* et *P. pastoris*

Afin de caractériser ce clivage, l'expression de l'*AtPLDα* s'effectue avec une étiquette poly-histidine (His)₆ en amino-terminal. Le gène *Nt-(His)₆AtPLDα* a été obtenu par la méthode de PCR avec des amorces spécifiques. L'amorce située en 5' du gène comprend les sites de restriction *KpnI*, *SacII*, *PciI*, les six codons qui permettent d'ajouter l'étiquette (His)₆ en amino-terminal et les cinq premiers codons du gène *AtPLDα*. L'amorce située en 3' du gène comporte, entre autres, le site *NotI*. Ceci permet de cloner ce gène (Figure 61) :

- dans les sites *KpnI* et *NotI* du plasmide pYES2 pour l'expression dans la levure *S. cerevisiae* ;
- puis de sous-cloner ce fragment dans les sites *SacII* et *NotI* du plasmide pGAPZB pour l'expression dans *P. pastoris* ;
- et enfin de le sous-cloner dans les sites *PciI* et *NotI* du plasmide pEt28b pour l'expression dans *E. coli*.

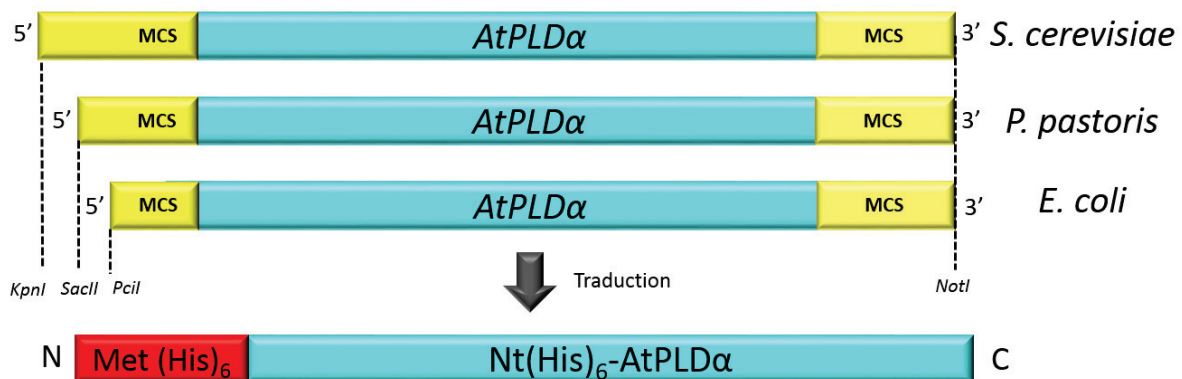


Figure 61 : Stratégie de clonage de l'*AtPLD* avec une étiquette 6xHis à l'extrémité N-terminale. N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale ; MCS : site de clonage multiple.

Cette protéine étiquetée en N-terminal sera purifiée sur colonne Ni-TED, afin de vérifier la présence de l'étiquette poly-histidine (His)₆ et ainsi de vérifier le clivage potentiel de la partie N-terminale.

3.2.2.2.2. Activité enzymatique et expression

L'expression de la *AtPLD* dans la levure *S. cerevisiae* s'effectue avec le plasmide pYES, un plasmide inductible au galactose (cf. 2.1.3.2.3. pYES2). Après induction, les cellules sont lysées et la fraction de protéines solubles est testée pour détecter l'activité de la PLD recombinante. Il se trouve que nous ne détectons pas d'activité enzymatique différente de celle du contrôle qui

correspond aux cellules de *S. cerevisiae* transformées par le vecteur vide et induites au galactose (Figure 62A). De plus, nous ne détectons pas la PLD par immunoempreinte avec un anticorps anti-PLD de soja dont on sait qu'il reconnaît la PLD d'*A. thaliana* (Figure 62B). Ainsi, l'expression dans *S. cerevisiae* de l'*At*PLD avec une étiquette (His)₆ ne fonctionne pas dans ce système.

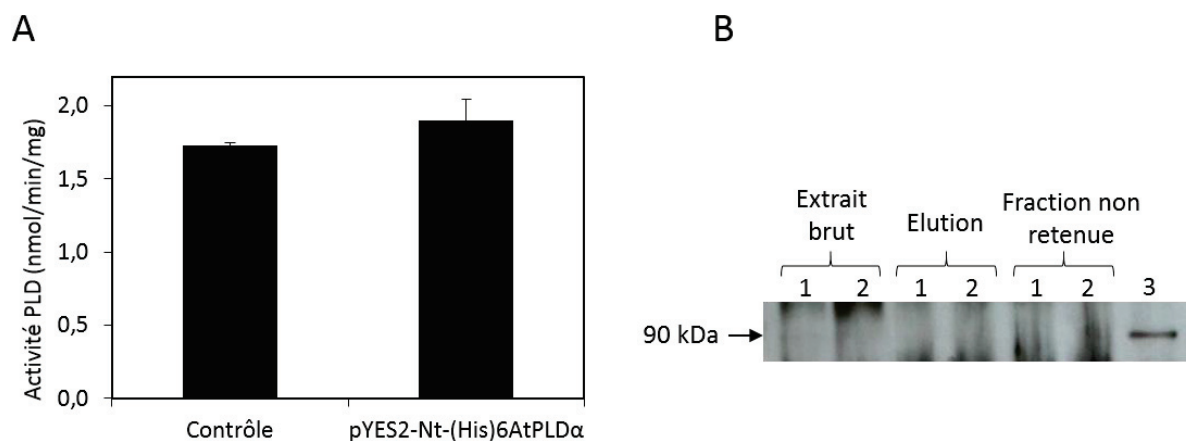


Figure 62 : Mesure de l'activité enzymatique et détection de la PLD exprimée dans des extraits cellulaires de *S. cerevisiae* par immunoempreinte.

A) Mesure de l'activité PLD dans un extrait brut de protéines solubles de *S. cerevisiae* transformée par le vecteur vide (contrôle) et par le vecteur pYES2-Nt-(His)₆AtPLD α . B) Analyse par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps anti-PLD de soja de l'expression de la Nt-(His)₆AtPLD α dans l'extrait brut et dans les fractions éluées et non retenues de la purification de la protéine sur colonne Ni-IDA. 1 : Extrait brut de cellules de *S. cerevisiae* transformées par le vecteur vide. 2 : Extrait brut de cellules de *S. cerevisiae* transformées par le plasmide pYES2-Nt-(His)₆AtPLD α . 3 : Nt-(His)₆AtPLD α purifiée en condition dénaturante chez *P. pastoris*.

L'expression de l'*At*PLD dans la bactérie *E. coli* s'effectue avec le plasmide pEt28b, un plasmide inductible à l'IPTG (cf. 2.1.3.2.1. pET28b et Figure 18). Après induction, de la même façon que précédemment, les cellules sont lysées et la fraction de protéines solubles est testée pour détecter l'activité de la PLD recombinante. Ici non plus nous ne détectons pas d'activité enzymatique différente de celle du contrôle qui correspond aux cellules d'*E. coli* transformées par le vecteur vide et induites à l'IPTG (Figure 63A). Cependant, en comparant avec les cellules induites transformées par le vecteur vide (Figure 63B) la migration des protéines totales en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) indique que l'expression de l'*At*PLD avec une étiquette (His)₆ a lieu.

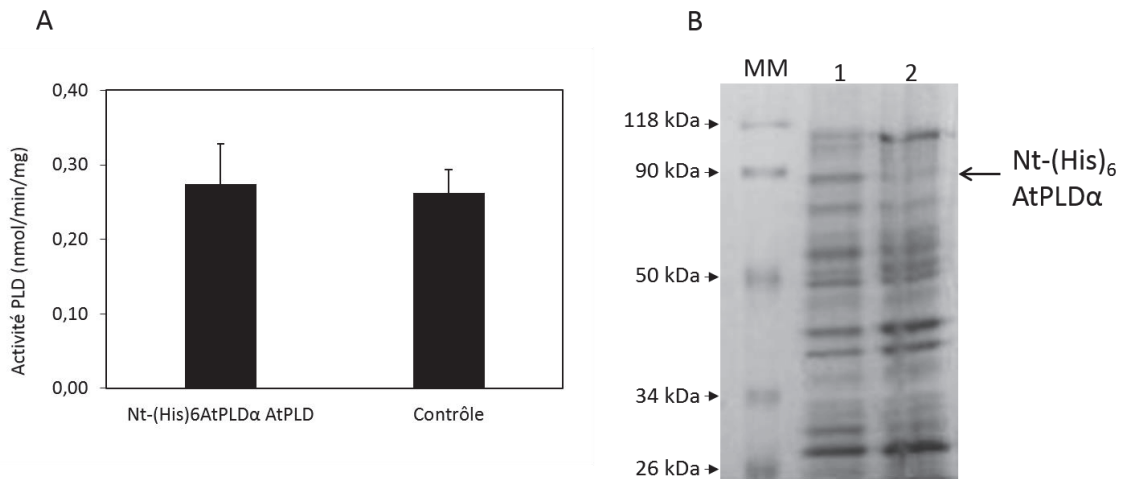


Figure 63 : Mesure de l'activité PLD dans les cellules d'*E. coli* BL21 transformées par la construction Nt-(His)₆AtPLD α et analyse par SDS-PAGE des protéines totales après induction à l'IPTG.

A) Mesure de l'activité PLD dans un extrait brut de protéines solubles de cellules d'*E. coli* transformées par le vecteur vide (contrôle) et par le vecteur pEt28b-Nt-(His)₆AtPLD α . B) Analyse par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps anti-PLD de soja. 1 : Extrait protéique totale de cellules d'*E. coli* transformées par le vecteur pEt28b-Nt-(His)₆AtPLD α . 2 : Extrait protéique total de cellules d'*E. coli* transformées par le vecteur vide. MM : marqueur de masse moléculaire.

Ces résultats vont à l'encontre des données de la littérature où des preuves de l'expression et de la purification en conditions natives de la PLD α végétale existent. Cependant, les niveaux d'activités sont souvent faibles et la protéine n'est pas toujours purifiée. Dans notre cas, la protéine d'*A. thaliana* est présente dans les corps d'inclusion de la bactérie et n'est donc pas susceptible d'être purifiée en conditions natives. Seul le système *P. pastoris* nous permet de mesurer une activité PLD dans l'extrait brut des protéines solubles et la PLD est visible par immunoempreinte avec des anticorps anti-domaines C2 et anti-(His)₆ (Figure 64).

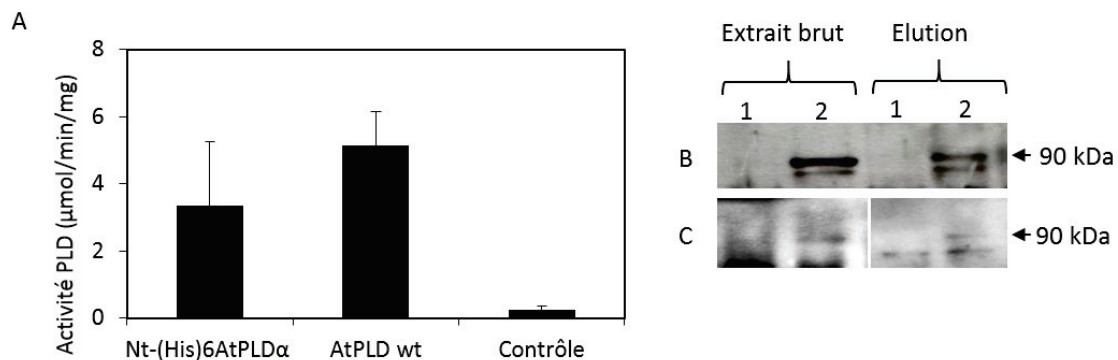


Figure 64 : Activité enzymatique et détection de la Nt-(His)₆AtPLD α dans la levure *P. pastoris* par immunoempreinte

A) Activité PLD spécifique dans la fraction soluble d'un lysat de cellules de *P. pastoris* exprimant la Nt-(His)₆AtPLD α , le PLD de type sauvage (wt) et le plasmide vide (contrôle).

Analyse par immunoempreinte de l'expression de la Nt-(His)₆AtPLD α dans l'extrait brut et dans les fractions éluées de la purification de la protéine sur colonne Ni-IDA en utilisant des anticorps anti-PLD de soja (B) ou des anticorps anti-(His)₆ (C). Pistes 1 : Extrait de cellules transformées par le vecteur vide pGAPZB. Pistes 2 : Extrait de cellules transformées par le vecteur pGAPZB-Nt-(His)₆AtPLD α .

Nous avons donc utilisé ce système pour purifier l'enzyme avec une étiquette (His)₆ sur une colonne de type Ni-IDA dont la propriété est de retenir spécifiquement l'étiquette (His)₆ (cf. 2.2.3. Purification de protéines). Nous pouvons suivre l'avancement de la purification par l'activité de l'enzyme. On note que la majorité de la PLD n'est pas retenue sur la colonne, dénotant qu'il s'agit ici ou bien de la protéine sous une forme clivée, ou bien une protéine dont le (His)₆ serait inaccessible. Cependant, on détecte aussi de l'activité PLD dans la fraction éluée de la colonne. Ceci indique que la PLD retenue sous forme entière possédant le (His)₆ est active. Ainsi, la maturation observée n'est pas responsable de l'activation de l'enzyme.

Nous avons donc mis au point une stratégie afin de discriminer les différentes formes possibles de l'enzyme en solution. Nous distinguons trois possibilités de protéines (Figure 65) :

- une forme clivée sans propeptide et donc sans étiquette (His)₆ qui ne devrait pas être retenue sur colonne de nickel ;
- une forme entière avec propeptide et étiquette (His)₆ qui serait retenue sur colonne de nickel et purifiée en conditions natives ;
- une forme entière mais dont l'étiquette (His)₆ serait inaccessible, qui ne serait pas retenue sur colonne de nickel en conditions natives mais qui pourrait l'être en conditions dénaturantes.

Après une première étape de purification, nous avons donc entrepris de dénaturer en présence de 8 M d'urée la fraction non retenue et de repasser cet extrait sur le même type de colonne chromatographique de nickel. En parallèle, pour confirmer la présence de l'étiquette (His)₆ dans la fraction retenue sur colonne de nickel lors de la première étape de purification et s'assurer qu'il ne s'agit pas de fixation aspécifique, nous avons dialysé la fraction d'éluion afin d'éliminer l'imidazole et dénaturer les protéines en présence de 8 M d'urée. Ici encore la même chromatographie est effectuée (Figure 65).

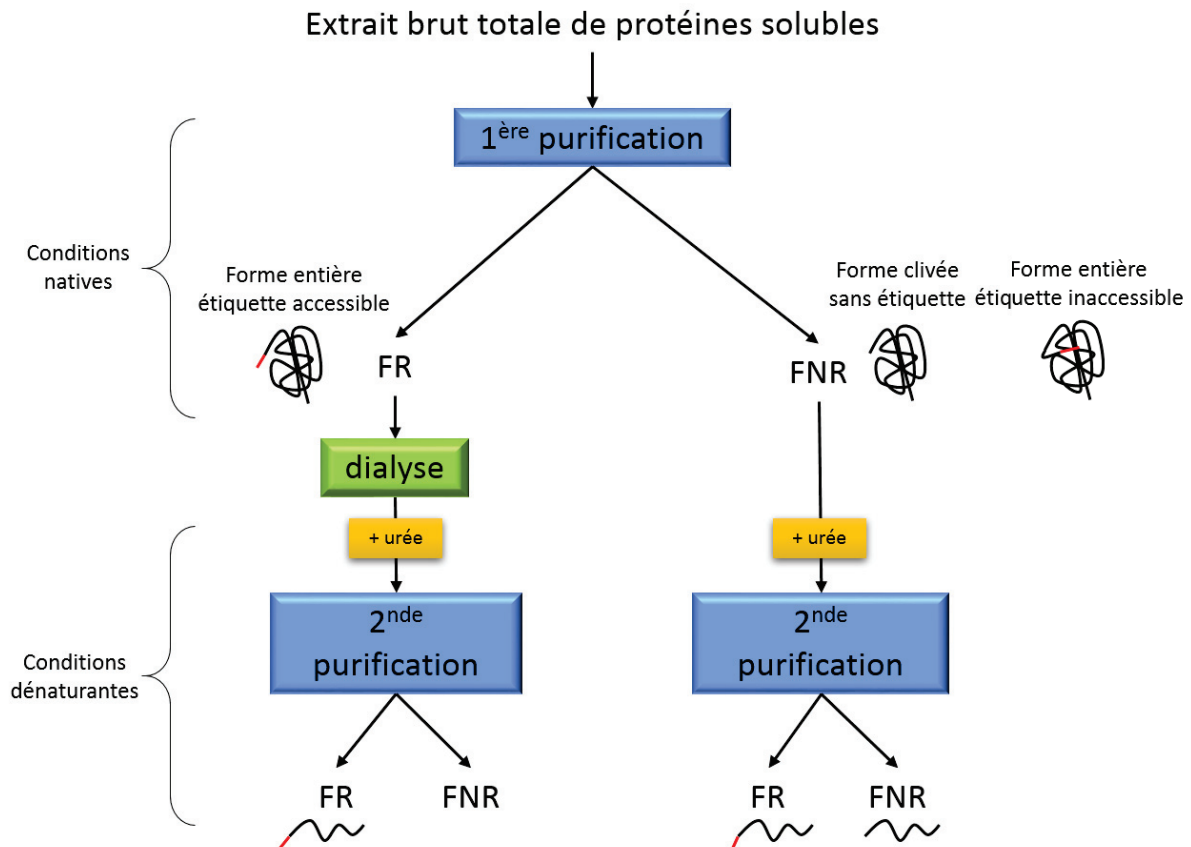


Figure 65 : Schéma de la stratégie d'identification et de purification de la Nt-(His)₆AtPLD α . À l'issue de la première purification sur colonne de nickel, trois formes de protéines peuvent exister : une forme clivée sans propeptide ni étiquette (His)₆, une forme entière avec propeptide et étiquette (His)₆ et une forme entière mais dont l'étiquette (His)₆ serait inaccessible. FNR : fraction non retenue ; FR : fraction retenue.

Malheureusement, peu de protéines purifiées sont disponibles et il est impossible de les détecter sur SDS-PAGE. De plus, au moment de la réalisation de cette expérience nous ne disposions pas encore de l'anticorps anti-domaine C2 et nos tentatives de détection de la PLD ou du (His)₆ par immunoempreinte sont demeurées sans succès. Sur ce point nous faisons face à un problème récurrent, le niveau d'expression de la PLD est trop faible pour :

- purifier la minorité de protéine (His)₆ à homogénéité ;
- étudier plus en amont le clivage de la protéine en N-terminal.

En partant du principe que le clivage du propeptide de la PLD est effectué par une protéase endogène de *P. pastoris*, nous avons essayé de reproduire ce clivage *in vitro*. Pour cela, nous avons purifié l'AtPLD à partir des corps d'inclusions d'*E. coli*, en conditions dénaturantes, sur une résine Ni-IDA qui retient spécifiquement l'étiquette (His)₆ de la PLD. Cette protéine est alors incubée avec un extrait brut de protéines solubles de *P. pastoris* de façon à faire agir la protéase *in vitro*. Le clivage est alors vérifié par la perte de l'étiquette en N-terminale détectée

par immunoempreinte après séparation des protéines par SDS-PAGE. Cependant, le bon traitement des résultats est difficile car nous n'avons pas assez de protéines pour espérer voir un signal par immunoempreinte et la qualité de nos anticorps ne permet pas ce niveau de détection.

3.2.2.2.3. Test de la souche *pep4* SMD1168

Le phénomène que nous observons est un clivage très probablement effectué par une protéase endogène de *P. pastoris*. Notre travail d'expression du gène codant la PLD dans la levure *S. cerevisiae* avait pour but final de tester plusieurs mutants de protéases comme il en existe pour cette souche de levure. Ce n'est pas le cas de *P. pastoris* où une seule protéase est mutée : la protéase aspartique PEP4 dans la souche SMD1168 (cf. 2.1.1.2.2. *Pichia pastoris* SMD1168).

La protéase PEP4 est une protéase aspartique homologue de la protéase PEP4 de *S. cerevisiae*. Ces deux protéases sont des homologues de la principale protéase aspartique végétale, la phytepsine.

La Cardosine A est une protéase aspartique du cardon dont il a été démontré il y a quelques années qu'elle interagissait avec le domaine C2 de la PLD α de cardon et clivait celui-ci quand la rupture de leur interaction était déclenchée (Simões et al., 2005). Il est tout à fait imaginable que PEP4 remplisse cette fonction dans la levure *P. pastoris* en tant qu'analogue de la cardosine A, d'autant plus qu'elle possède elle aussi le peptide RGD (sous la forme EGK) responsable de l'interaction.

Nous avons donc exprimé la construction *Nt-(His)₆AtPLD α* dans cette souche SMD1168. On détecte bien l'activité PLD dans un extrait brut de protéines solubles. Plusieurs résines de purification ont été testées : Ni-TED, Ni-IDA, Ni-NTA, cobalt Co²⁺ (Figure 66). Pour chacune d'entre elles, la même quantité de protéine issue du même extrait protéique est déposée sur gel lors de l'analyse par SDS-PAGE.

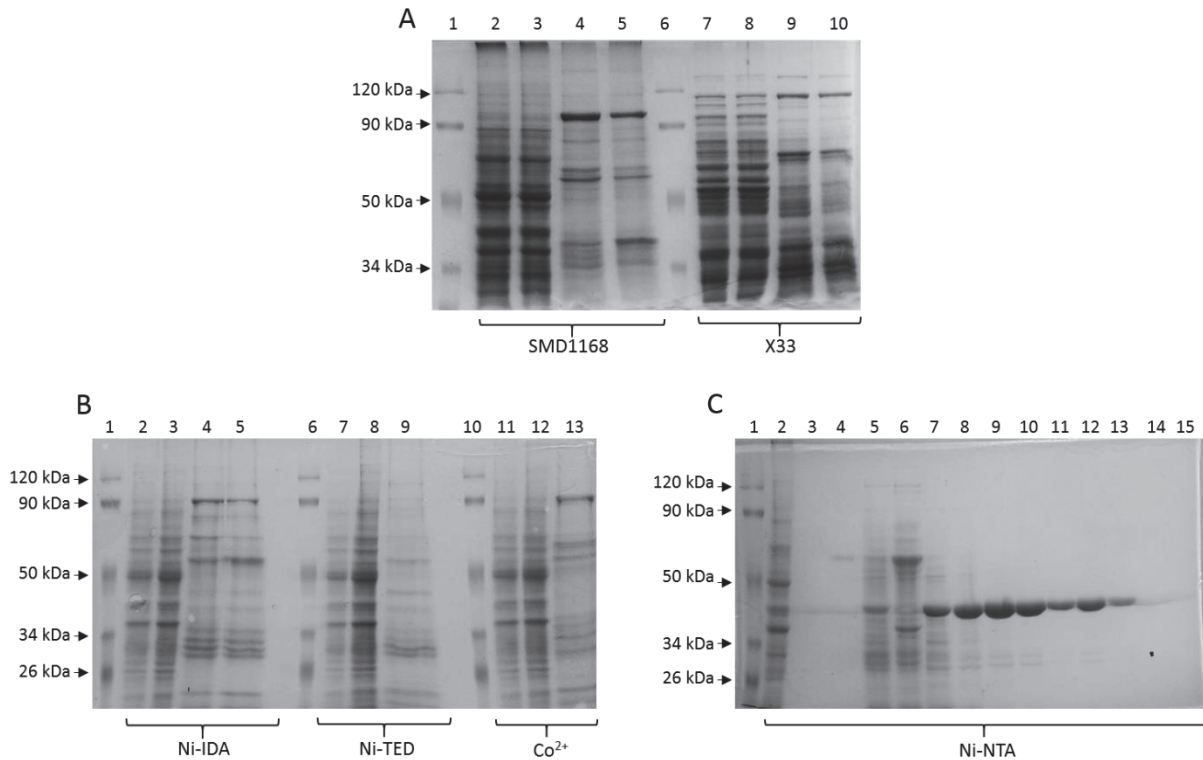


Figure 66 : Analyse par SDS-PAGE (10 %) de la purification de Nt-(His)₆AtPLD α par chromatographie d'affinité aux ions métalliques immobilisés.

A) Analyse comparative de la purification sur colonne de Ni-IDA de la Nt-(His)₆AtPLD α exprimée dans la souche SMD1168 de *P. pastoris* (pistes 2 à 5) et X33 (pistes 7 à 10). Pistes 1 et 6 : marqueur de masse moléculaire. Pistes 2 et 7 : extrait brut de protéines solubles. Pistes 3 et 8 : Fractions non retenues. Pistes 4 et 9 : Fractions retenues n°1. Pistes 5 et 10 : Fractions retenues n°2.

B) Analyse comparative des fractions retenues sur colonne de Ni-IDA (pistes 2 à 5), Ni-TED (pistes 7 à 9) et Co²⁺ (pistes 11 à 13) de la Nt-(His)₆AtPLD α exprimé chez SMD1168. Pistes 1, 6 et 10 : marqueur de masse moléculaire. Piste 2, 7 et 11 : extrait brut de protéines solubles. Piste 3, 8 et 12 : fractions non retenues. Piste 4, 5, 9 et 13 : fractions retenues.

C) Analyse de la purification de Nt-(His)₆AtPLD α exprimée chez SMD1168 sur Ni-NTA avec gradient d'élution de 0 à 250 mM d'imidazole. Piste 1 : marqueur de masse moléculaire. Piste 2 : extrait brut de protéines solubles : Pistes 3 à 13 : fractions retenues n°50 à 60. Pistes 14 et 15 : fractions retenues n° 91 et 92.

Tout d'abord, il semble que l'on soit capable de purifier nettement plus de protéines Nt-(His)₆AtPLD α à partir de la souche SMD1168 (pistes 4 et 5 Figure 66A) comparé à la souche X33 (pistes 9 et 10 Figure 66A). En testant différentes résines permettant de fixer spécifiquement l'étiquette (His)₆, on note que le Ni-IDA (piste 4 et 5 Figure 66B) et le Co²⁺ (pistes 13 Figure 66B) sont beaucoup plus efficaces que le Ni-TED (piste 9 Figure 66B). Au contraire, la purification sur Ni-NTA ne permet pas la fixation de la protéine étiquetée (His)₆ mais un contaminant à 40 kDa environ (pistes 7 à 13 Figure 66C).

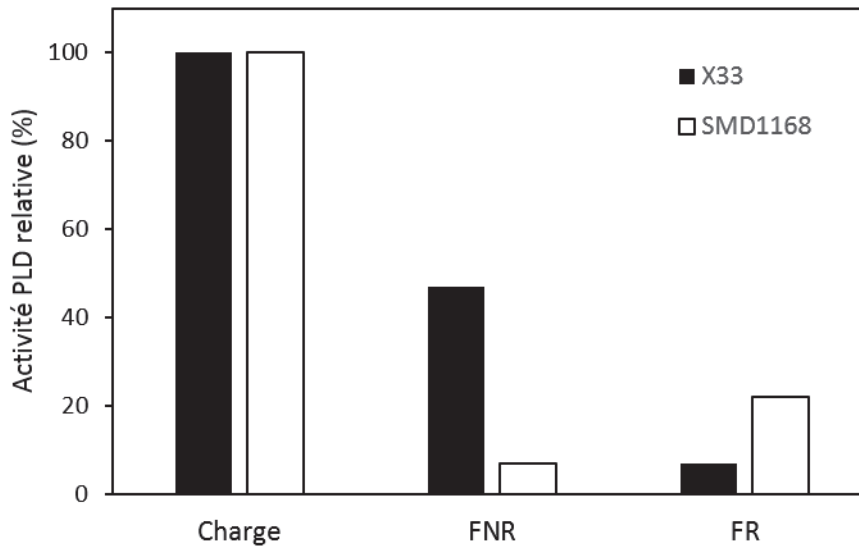


Figure 67 : Activité PLD relative (%) des fractions de purification de la Nt-(His)₆AtPLD α sur Ni-IDA. L'activité enzymatique de chaque fraction est exprimée par rapport à l'extrait brut de protéines solubles de la souche correspondante rapporté à 100 %. Charge : extrait brut soluble ; FNR : fraction non retenue ; FR : fraction retenue n°1.

En termes d'activité, on note une activité totale plus importante dans la fraction éluée de la Nt-(His)₆AtPLD α purifiée sur colonne Ni-IDA à partir de SMD1168 (Figure 67). Cependant, les quantités purifiées ne permettent toujours pas d'étudier le clivage en N-terminal. Des tentatives d'optimisation de la purification ont été effectuées sans succès et les résultats présentés dans la Figure 66A sont difficilement reproductibles.

Dans notre cas, on ne note pas de différence majeur du niveau d'expression de la protéine à partir de la souche mutée sur PEP4 par rapport à l'expression dans la souche sauvage X33. Cet effet pourrait être dû à un plus fort niveau d'expression. De fait, on ne contrôle pas le lieu de l'insertion du gène dans le génome et nous avons déjà observé des niveaux d'expression différents pour des clones équivalents (Figure 28) Il n'est en tout cas pas possible de déterminer si PEP4 est tout ou partie responsable du clivage du propeptide. Ainsi, n'observant pas de différence évidente entre la souche X33 et la souche SMD1168, la première sera donc utilisée dans la suite de nos expériences.

3.2.2.3. Mutagenèse dirigée du site de clivage

Pour rappel, une idée communément admise dans la littérature suggère que la libération du propeptide permettrait au domaine C2, situé directement en aval du propeptide, d'avoir une nouvelle conformation rendant son interaction possible avec les membranes et assurant ainsi le

rôle catalytique des PLD. Cette maturation est alors vue comme un système de régulation de l'activité enzymatique des PLD et le propeptide est considéré comme un élément d'adressage de la protéine vers un autre compartiment cellulaire.

Pour les expériences suivantes nous construisons des mutants du site de clivage. Nous ne cherchons plus désormais à purifier ou enrichir la Nt-(His)₆AtPLD α mais nous allons utiliser sa propriété de se fixer sur la colonne Ni-IDA et en révélant par immunoempreinte nous pourrions ainsi distinguer si la protéine exprimée est retenue ou non. Nous allons tester chaque mutant pour cette propriété ainsi que pour son activité catalytique. Nous pourrions ainsi discriminer les mutants pour lesquels le clivage a lieu, ceux pour lesquels le clivage n'a pas lieu en raison de la mutation, mais nous pourrions aussi distinguer l'impact de la mutation et de l'éventuel clivage sur l'activité enzymatique.

3.2.2.3.1. Construction des mutants avec une étiquette 6xHis

Chez la PLD d'*A. thaliana* exprimée dans la levure, la séquence A/NVEE au niveau de laquelle la coupure s'effectue entre les résidus A35 et N36 (Rahier et al., 2016a) a été modifiée ponctuellement par mutagenèse dirigée afin d'obtenir une séquence non clivable. Les mutations A35L et N36A sont effectuées sur le gène Nt-(His)₆AtPLD α cloné dans le plasmide pGAPZB, permettant l'expression dans *P. pastoris*. Ces mutations sont réalisées à l'aide d'amorces de PCR comportant les mutations nucléotidiques désirées (cf. 2.1.3.6.1. PCR).

Une autre construction pour exprimer cette protéine sans son propeptide a été effectuée par mutagenèse dirigée en mutant simultanément les résidus A35 et N36 en les substituant par les résidus respectifs H35 et M36, c'est la construction AN36HM. La séquence ADN codant le dipeptide HM est aussi le site de restriction de l'enzyme NdeI (CA/TATG). Ce site se trouve également juste en aval de 100 pb environ du fragment d'ADN codant l'étiquette polyhistidine. Une digestion de la construction par NdeI, puis une religation permet de se débarrasser de la séquence correspondant au propeptide et d'obtenir une protéine avec une étiquette (His)₆ en amino-terminal fusionnée directement au niveau du site de clivage (Figure 68).

Ainsi, nous obtenons une PLD sous forme entière étiquetée (His)₆ et mutée sur les deux résidus du site de clivage (construction AN36HM) et une PLD tronquée avec une étiquette (His)₆ en lieu et place du propeptide.

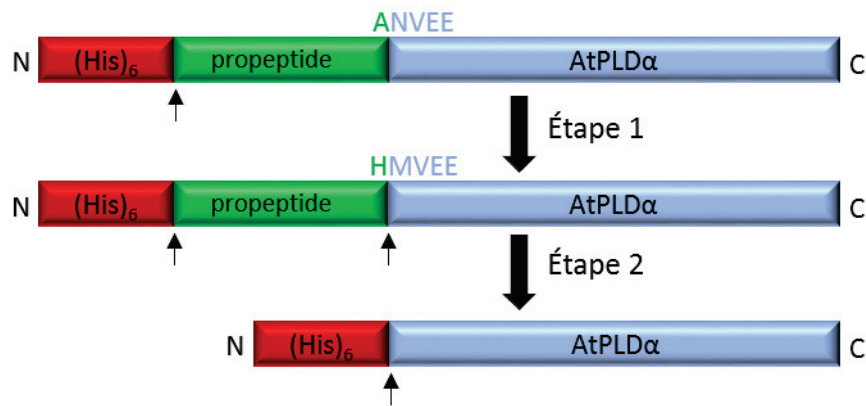


Figure 68 : Schéma de la construction de l'AtPLD α sans son propeptide.

Étape 1) Mutagenèse dirigée du plasmide correspondant. Étape 2) Étapes de digestion, ligation et expression du plasmide correspondant. Les flèches indiquent le site de restriction *NdeI* dans la séquence nucléotidique correspondant à la protéine représentée. N : extrémité N-terminale. C : extrémité C-terminale.

3.2.2.3.2. Activité catalytique, purification et expression des mutants

Chaque mutant est testé pour son activité catalytique. On note qu'on ne distingue pas de différence réelle d'activité enzymatique entre la PLD exprimée avec une étiquette (His)₆ et la PLD de type sauvage (sans étiquette) dans l'extrait brut de protéines solubles (Figure 69A). Aucune activité enzymatique n'a été détectée pour le mutant N36A. Il semblerait qu'il y a un peu d'activité dans les mutants A35L et AN36HM où l'activité enzymatique est légèrement au-delà du bruit de fond (extrait brut d'une souche transformée par le vecteur vide) mais l'absence de répliquas ne nous permet pas de conclure quant à la présence ou non d'une réelle activité catalytique (Figure 69A).

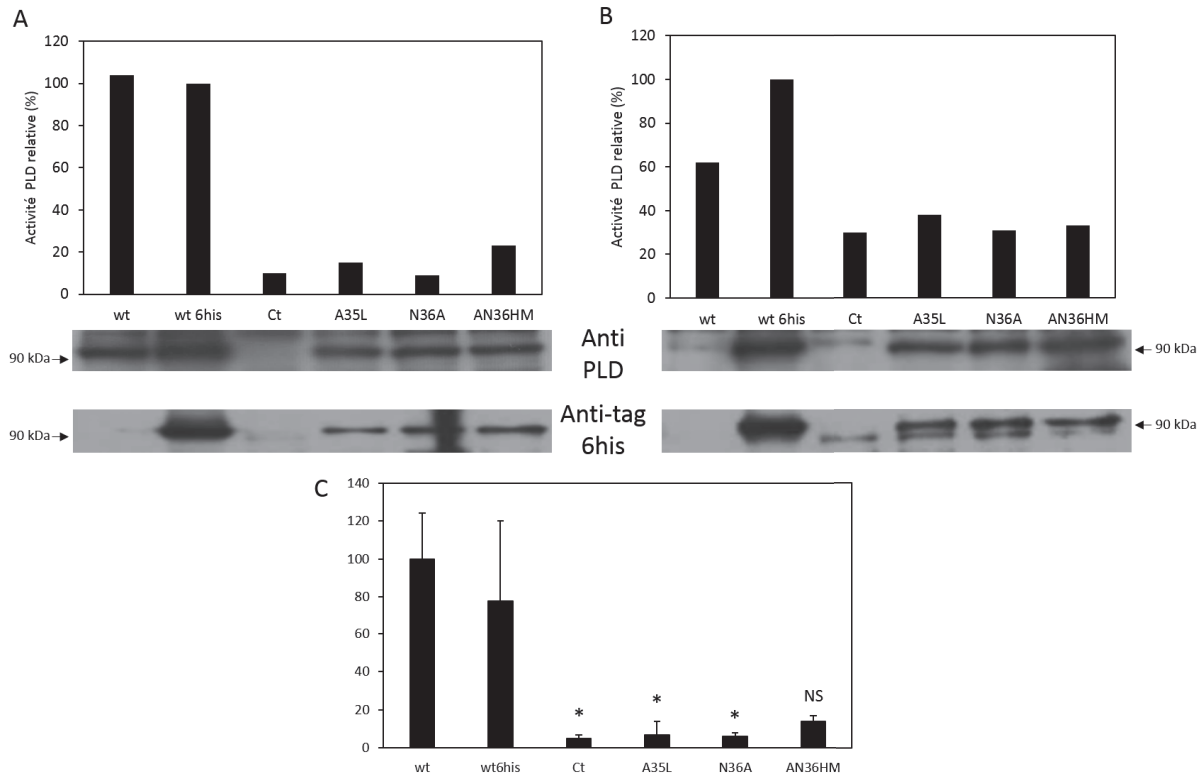


Figure 69 : Activité PLD relative (%) des constructions étiquetées (His)₆.

A) Analyse des extraits bruts avant purification. Activité relative des extraits bruts de *P. pastoris* exprimant la PLD de type sauvage (wt), la PLD de type sauvage fusionnée à une étiquette (His)₆, le vecteur vide comme contrôle (Ct) et les mutants du site de clivage. Révélation par immunoempreinte avec un anticorps anti-PLD et anti-(His)₆. L'activité est calculée en singulet relativement au wt. B) Analyse des éluions de purification sur Ni-IDA des mêmes échantillons. Révélation par immunoempreinte avec un anticorps anti-PLD et anti-(His)₆. L'activité est calculée en singulet relativement au wt 6his. C) Activité relative des extraits bruts de *P. pastoris* exprimant la PLD de type sauvage (wt), la PLD de type sauvage fusionnée à une étiquette (His)₆, le vecteur vide comme contrôle (Ct) et les mutants du site de clivage extraits dans le tampon de lyse Tris/NaCl/Sucrose. L'activité est calculée relativement au wt sur trois clones indépendants ($p < 0,05$, sauf pour la construction AN36HM).

On note de l'activité dans l'élution de la PLD sans étiquette (Figure 69B). De fait, il semble qu'une faible partie de l'enzyme exprimée se fixe de façon aspécifique sur ce type de colonne. Pour ce qui est de l'analyse de l'activité dans l'élution après passage sur la colonne Ni-IDA (Figure 69B) on note une activité plus importante pour la PLD (His)₆ que pour la PLD de type sauvage. Ceci est normal dans le sens où la PLD (His)₆ est enrichie sur la colonne et donc présente en plus grande quantité. Dans la continuité des extraits bruts de protéines solubles, on ne note pas d'activité enzymatique non plus dans les fractions éluées des mutants (Figure 69B). La révélation par immunoempreinte nous permet de confirmer la présence des protéines exprimées et nous pouvons confirmer que ces enzymes, du moins le type sauvage (wt 6xHis), les constructions A35L, N36A et AN36HM sont bien étiquetées. Nous détectons donc la

présence de l'étiquette au niveau de 90 kDa témoignant du fait qu'elle n'est pas clivée ou du moins pas toute la population de protéines recombinantes exprimée (Figure 69A).

Après purification sur résine Ni-IDA, on note que l'on peut retenir la PLD (His)₆ au niveau de 90 kDa détectée par l'anticorps anti-(His)₆ et l'anticorps anti-domaine C2 (Figure 69B). À l'inverse et comme dans la charge de la colonne, on ne détecte aucun signal pour notre témoin négatif qui est un extrait purifié à partir de cellules transformées par le vecteur vide. On observe une très faible bande de PLD à 90 kDa dans le type sauvage et aucun signal de l'étiquette démontrant qu'une portion faible de PLD est retenue sur la colonne. On note cependant que nous sommes capables de retenir les mutants A35L, N36A et AN36HM, confirmant ainsi que ceux-ci ne sont pas ou pas complètement clivés (Figure 69B).

L'expression de l'enzyme avec une étiquette (His)₆ à la place du propeptide ne donne pas lieu à une protéine active. En réalité, les résultats quant à l'expression de cette construction sont inégaux. La protéine est difficile à détecter par immunoempreinte que ce soit avec un anticorps anti-domaine C2 ou anti-(His)₆ avant ou après purification. Ceci semble indiquer son instabilité.

En retenant la PLD sauvage (His)₆ nous ne pouvons pas distinguer la proportion de mutants qui présentent une différence dans cette condition. Si la mutation affecte le phénomène de clivage, nos conditions ne nous permettent pas de l'observer. Que les protéines soient mutées sur un des deux résidus du site de clivage, A35L ou N36A, sur les deux résidus AN36HM ou ne soient pas mutées, il n'y a pas de différence de comportement sur ce type de chromatographie d'affinité aux ions métalliques immobilisés.

À ce sujet, il est important de noter que nous travaillons ici dans un tampon phosphate composé de NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0, 300 mM NaCl (cf. 2.2.3. Purification de protéines). Ce tampon n'est pas un tampon idéal pour mesurer l'activité PLD car la présence du phosphate chélate les ions calcium que nous ajoutons pour la mesure de l'activité enzymatique, et il précipite sous forme de phosphate de calcium.

Cependant, si nous utilisons un autre tampon comme le tampon de lyse des cellules de *P. pastoris* par exemple, composé de Tris 20 mM pH 8, NaCl 150 mM et Sucrose 200 mM, la PLD de type sauvage sans étiquette (His)₆ est alors très bien retenue sur colonne (Figure 70A, élution piste 3). Nous ne pouvons dès lors plus distinguer l'enzyme 6xHis de l'enzyme sauvage.

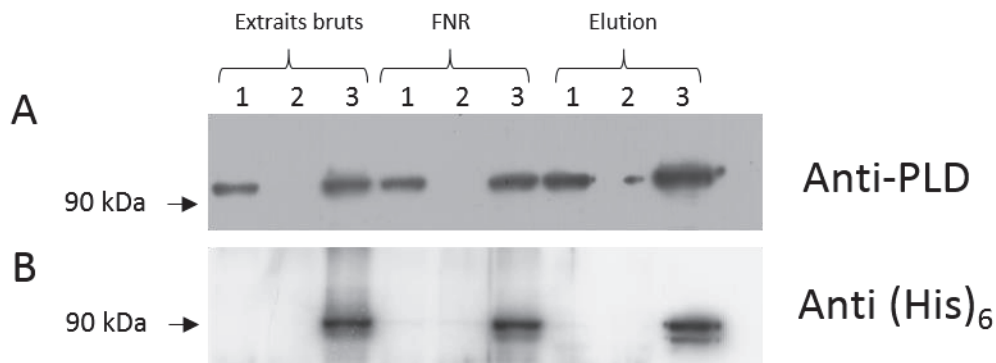


Figure 70 : Révélation par immunoempreinte des fractions issues de la purification sur Ni-IDA dans le tampon de lyse Tris/NaCl/Sucrose.

A) Anticorps anti-domaine C2. B) Anticorps anti-6xHis. Pistes 1 : extrait protéique de cellules transformées par le gène codant la PLD sauvage. Pistes 2 : extrait protéique de cellules transformées par le plasmide vide. Pistes 3 : extrait protéique de cellules transformées par le gène Nt-(His)₆AtPLDα. FNR : Fraction non retenue.

Ainsi, pour mesurer l'activité catalytique dans le tampon phosphate nous sommes obligés d'ajouter peu de protéines dans le test pour limiter la quantité de tampon phosphate ce qui réduit la capacité de détection de l'activité PLD. Il n'est pas envisageable dans notre cas de dialyser car la quantité de PLD est trop faible après purification.

3.2.2.4. Discussion

De précédents travaux au sein de notre équipe avaient permis d'identifier le site de clivage du domaine C2 de la PLD d'*A. thaliana* exprimée de façon recombinante dans *P. pastoris* (Rahier et al., 2016a). Nous nous sommes servis de ces données pour étudier ce clivage, qui s'avère être un phénomène commun à toutes les PLD végétales purifiées sur un support hydrophobe (voir tableau 1). Tout à fait curieusement ce phénomène n'a, jusqu'alors, jamais été étudié en profondeur mais uniquement constaté. Nous avons donc étudié cette enzyme avec une étiquette en N-terminal de façon à observer ce clivage en utilisant la propriété de cette étiquette d'être retenue sur colonne de nickel.

La première observation est que nous ne pouvons pas purifier à homogénéité avec l'étiquette (His)₆. Deux raisons sont possibles pour expliquer cela. Tout d'abord la quantité de protéines exprimées est peut-être trop faible, l'expression constitutive de la protéine ne permet peut-être pas de produire suffisamment de PLD (His)₆ pour purifier à l'aide de ce type de colonne. La seconde possibilité est le clivage de l'enzyme : si l'enzyme est clivée au moins en partie, cela réduit la quantité de PLD susceptible de se fixer sur la colonne de nickel. De fait, nous observons après purification que la majorité de la PLD est clivée puisqu'elle n'est pas retenue sur la colonne. La minorité de PLD entière retenue sur la colonne est encore active, ce qui

reconsidère les données de la littérature qui postulent un clivage permettant l'activation de l'enzyme (Ueki et al., 1995; Wang et al., 1994). Cependant, comme nous le montrons par la suite, la PLD sans étiquette est capable de se fixer sur ce type de colonne. Il nous est donc impossible de conclure si la PLD avec une étiquette (His)₆ possède de l'activité enzymatique.

Nos données à ce sujet entrent régulièrement en contradiction avec la littérature où aucun doute ne subsiste quant au phénomène de clivage et où il semble que toute l'enzyme exprimée et purifiée soit clivée. Nous montrons ici l'aspect partiel de ce phénomène que ce soit en exprimant et purifiant la PLD de *V. unguiculata* dont on montre que 75 % de l'enzyme n'est pas clivée après purification par chromatographie hydrophobe ou bien en montrant qu'une étiquette ajoutée en N-terminale n'est pas nécessairement clivée lorsque l'enzyme est exprimée.

3.2.2.5. Conclusions & perspectives

Lors de l'expression de la PLD avec une étiquette (His)₆ nous n'avons pas réussi à détecter l'activité PLD, ni la présence de la protéine dans la levure *S. cerevisiae* et la bactérie *E. coli*. Notre étude porte donc sur une enzyme exprimée dans la levure *P. pastoris*.

Nous avons voulu par la suite tester l'incubation de l'enzyme entière purifiée en condition dénaturante avec un extrait brut de protéines de *P. pastoris* pouvant contenir la protéase responsable du clivage de la protéine, mais la mauvaise qualité des anticorps utilisés au moment où a été réalisé ce travail n'a pas permis de visualiser de résultat probant. Il est tout à fait envisageable de reproduire cette expérience avec le nouvel anticorps anti-PLD dirigé contre le domaine C2 de la protéine dans les conditions optimisées de transfert et d'incubation. De la même façon l'obtention d'un anticorps spécifique des trente-cinq premiers résidus permettrait de cribler la présence ou l'absence du propeptide et donc de caractériser le clivage.

Nous avons postulé que le clivage pourrait être provoqué par une protéase endogène de la levure *P. pastoris*. Ainsi, nous avons testé l'expression de la PLD (His)₆ dans la souche SMD1168 dont la protéase PEP4 est inactive. Ici encore, si une plus forte activité enzymatique est présente dans l'élution, il semble que la PLD soit toujours clivée dans cette souche. Rien ne nous permet, par ailleurs, d'affirmer qu'il existe une réelle différence au niveau de la quantité de protéines clivées.

Aussi, nous avons mis au point des mutants du site de clivage. Les protéases étant spécifiques d'un site, en bloquant l'action de celles-ci il aurait été possible d'exprimer uniquement une enzyme entière avec son étiquette. Il se trouve qu'il est difficile d'observer le clivage en

purifiant sur ce type de colonne car autant de PLD (His)₆ que de protéine mutée est retenue sur ce type de colonne. Ceci ne nous permet donc pas de conclure quant au clivage des mutants.

Un biais majeur demeure dans notre expérience. Tout d'abord nous sommes forcés, pour les raisons exprimées plus haut, de travailler dans le tampon phosphate pour être dans les meilleures conditions de purification et ne pas retenir la PLD sauvage (Figure 70). Or ce tampon n'est pas adapté à la mesure de l'activité catalytique. Ensuite, d'autres constructions peuvent être étudiées. Nous avons vu que l'expression des mutants n'empêche pas le clivage. Nous avons aussi construit une enzyme sans propeptide (cf. 3.2.1. Le domaine catalytique minimal de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*) et nous n'avons détecté aucune activité enzymatique. Ici, nous avons remplacé le propeptide par un peptide (His)₆ ; l'enzyme n'est pas active et difficilement détectable par immunoempreinte ce qui semble signifier son instabilité. Ces résultats renforcent l'idée que l'expression de l'enzyme et sa stabilité nécessitent la présence du propeptide. Nous pourrions tester une autre construction qui serait d'intégrer le peptide (His)₆ entre le propeptide et la PLD (Figure 71). Ceci permettrait l'adressage de l'enzyme nécessaire à son activité grâce à la présence du propeptide. Si celle-ci est clivée, le peptide est toujours conservé et l'enzyme est purifiable de la même façon que si celle-ci n'est pas clivée. Le doute subsiste cependant quant à l'activité catalytique d'une telle enzyme modifiée car la simple mutation ponctuelle de cette protéine (A35L ou N36A) entraîne déjà l'abolition de l'activité.



Figure 71 : Proposition de construction d'une PLD 6xHis
L'étiquette 6xHis (en rouge) est insérée entre le propeptide de l'enzyme (en noir) et le cœur catalytique (en bleu). N, extrémité N-terminale. C, extrémité C-terminale.

3.2.3. Criblage, identification et caractérisation d'un nouvel inhibiteurs des PLDs

Nous avons aussi cherché, dans ce travail de thèse, à moduler l'activité enzymatique par mutagenèse dirigée au sein de la séquence protéique en effectuant des mutations atteignant sa capacité catalytique (cf. 3.1.1. Mutagenèse dirigée de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*) ou la régulation post-traductionnelle (cf. 3.2.2. Étude de la partie amino-terminale de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*), ou bien en réduisant de façon séquentielle la taille de la protéine en N-terminal (cf. 3.2.1. Le domaine catalytique minimal de la PLD d'*Arabidopsis thaliana*). Nous nous attarderons dans cette partie sur la modulation de l'activité enzymatique de la PLD grâce à une molécule tierce. Nous cherchons en particulier à trouver un inhibiteur spécifique des PLD.

Comme nous les décrivions en introduction (cf. 1.3.3.8. Rôles physiologiques de la PLD), les PLD sont de véritables cibles thérapeutiques puisqu'on les retrouve impliquées, *via* la formation de PA, dans des voies de signalisation directement responsables de pathologies majeures telles que la maladie d'Alzheimer, des cancers ou encore la sclérose en plaque. De la même façon, la formation de PA perturbe la structure des membranes biologiques et favorise, par exemple, l'internalisation et la sécrétion de virus (Brown et al., 2017). Il est important de noter que l'inhibition de la PLD avec les inhibiteurs connus actuellement a constitué jusqu'à présent de véritables preuves de son importance au sein du métabolisme. Une étude montre qu'une tumeur implantée chez une souris PLD1^{-/-} se développe moins en termes de masse et de taille et montre une vascularisation moindre que chez une souris de type sauvage. De plus, en inhibant l'activité PLD1, les auteurs montrent que la taille de la tumeur, sa masse et sa capacité métastatique sont plus faibles (Chen et al., 2012).

Des inhibiteurs ont été décrits et testés. Beaucoup d'entre eux dérivent de l'halopémide qui inhibe les PLD1 et 2 humaines avec une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire (Scott et al., 2009). Toutefois cet inhibiteur, comme ses dérivés, n'interagit pas avec le site catalytique mais se fixe sur un site allostérique de l'enzyme (Lewis et al., 2009). Les inhibiteurs de la PLD humaine décrits aujourd'hui inhibent avec succès une PLD procaryote (*Streptomyces chromofuscus*) qui ne contient pas le motif HKD (Kulkarni et al., 2014). Ici, avec le criblage d'une chimiothèque, nous souhaitons mettre à jour de nouveaux inhibiteurs. Pour cela nous utilisons un outil inédit à ce jour : une PLD recombinante à motif HKD eucaryote purifiée à homogénéité, la PLD de *V. unguiculata*. Nous avons montré au cours du chapitre 1 les similarités structurales et

fonctionnelles entre les PLD végétales et mammifères, ceci justifie notre objet d'étude qui nous permet de cribler des inhibiteurs de PLD.

Les travaux présentés ci-après sur le criblage de la chimiothèque, sa mise au point et les premières caractérisations de l'inhibiteur KBY7, mais aussi le test de la PLD végétale en présence des inhibiteurs connus des PLD ont été initiés successivement par Houda Abla et Karim Bessaa au cours de stage de Master 2 au laboratoire. La qualité de leur travail et de leurs résultats a constitué une avancée inestimable dans ce projet, soutenue par la Ligue contre le cancer, comité de Haute-Savoie, intitulé « Criblages de nouveaux inhibiteurs des phospholipases D comme cible thérapeutique des cancers ». À l'exclusion de leurs résultats obtenus décrits dans les parties 3.2.3.1 et 3.2.3.2 de ce chapitre pour des raisons de clarté, les résultats suivants présentés ont été obtenus dans le cadre de mes travaux de thèse. De même, l'action de KBY7 sur les cellules cancéreuses et l'analyse par spectrométrie de masse de la composition de KBY7 ont été effectués par mes soins.

3.2.3.1. Les inhibiteurs connus et leur effet sur la PLD végétale

Comme preuve de concept dans un premier temps et pour valider ensuite notre capacité à mesurer l'activité PLD et son inhibition, nous avons testé les inhibiteurs des PLD humaines ou végétales décrits dans la littérature.

3.2.3.1.1. Les inhibiteurs universels

Le vanadate (Na_3VO_4) ($\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$) comme le tungstate (Na_3WO_4) ($\text{IC}_{50} = 500 \mu\text{M}$), dont la géométrie est similaire à celle du phosphate ($\text{IC}_{50} = 100 \mu\text{M}$) et est susceptible de mimer le groupement acide phosphorique d'un phospholipide, sont tous deux des inhibiteurs de l'activité PLD *in vitro*. Le vanadate est l'inhibiteur à la plus faible IC_{50} parmi les trois citées ci-dessus (Figure 72B).

Des dérivés du vanadate ayant une hydrophobicité croissante ont été testés. Il semble alors que l'hydrophobicité du vanadate n'influence pas sa capacité inhibitrice (Figure 72C).

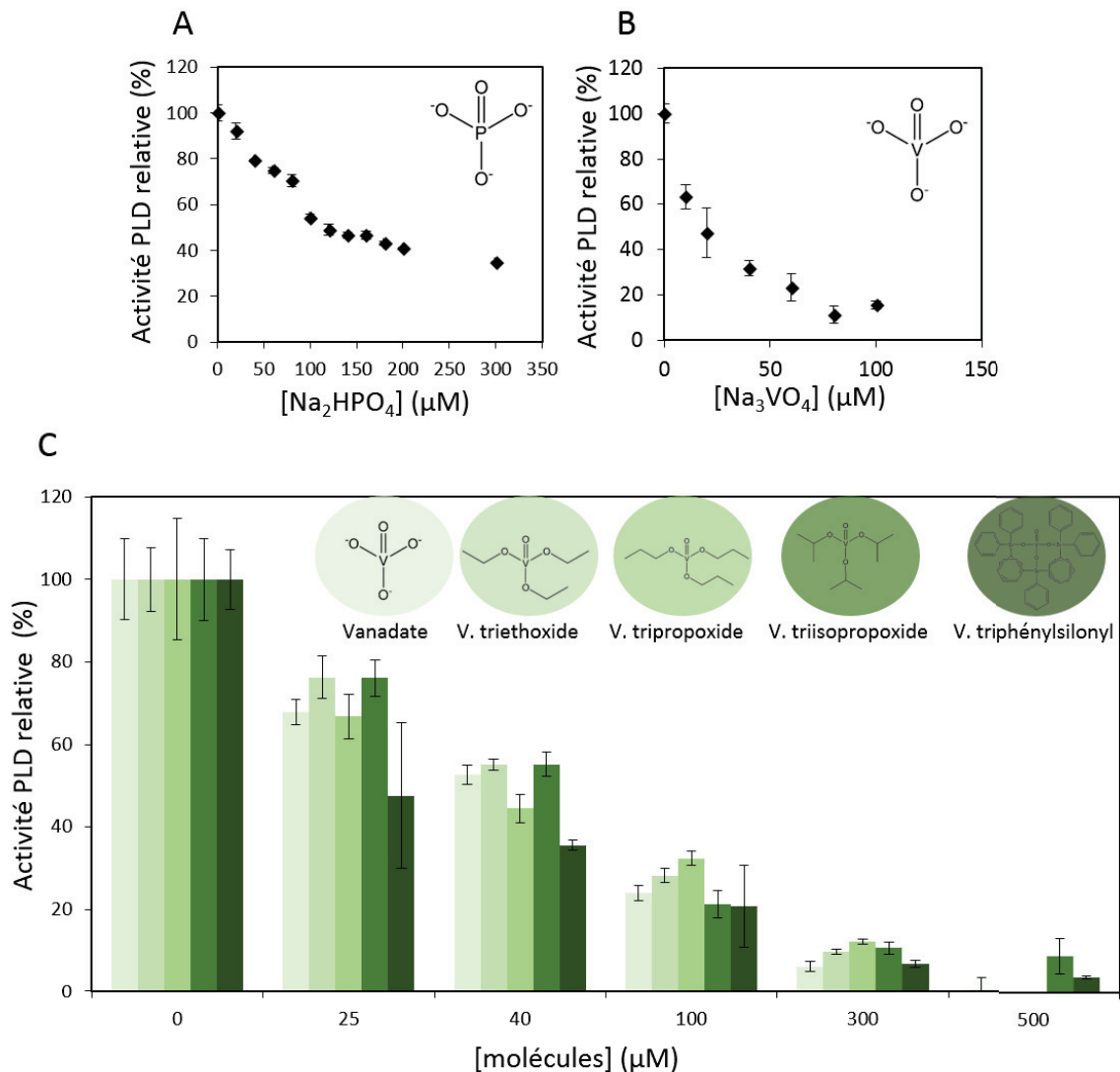


Figure 72 : Activité de la *Vu*PLD en présence de phosphate, de vanadate et de ses dérivés. A) Inhibition par le phosphate. B) Inhibition par le vanadate. C) Inhibition par les dérivés du vanadate.

3.2.3.1.2. Les inhibiteurs des PLD végétales

Les inhibiteurs des PLD végétales décrits dans la littérature (cf. 1.3.3.9. Inhibiteurs des PLD) ont été testés sur *Vu*PLD pure. Ainsi, il apparaît que, dans nos conditions, le resvératrol, la ciclosporine A, l'hexanal et l'hexanol ne sont pas des inhibiteurs de la PLD *in vitro* (Figure 73).

Enfin, le palmitoylethanolamide (C16:0), un NAE dont l'effet inhibiteur est lui-aussi décrit dans la littérature, est testé sur l'activité de *Vu*PLD et nous n'avons observé aucun effet inhibiteur (Figure 73).

Ainsi, les inhibiteurs jusqu'à présent décrits pour les PLD végétales n'ont pas d'effet inhibiteur sur *Vu*PLD pure.

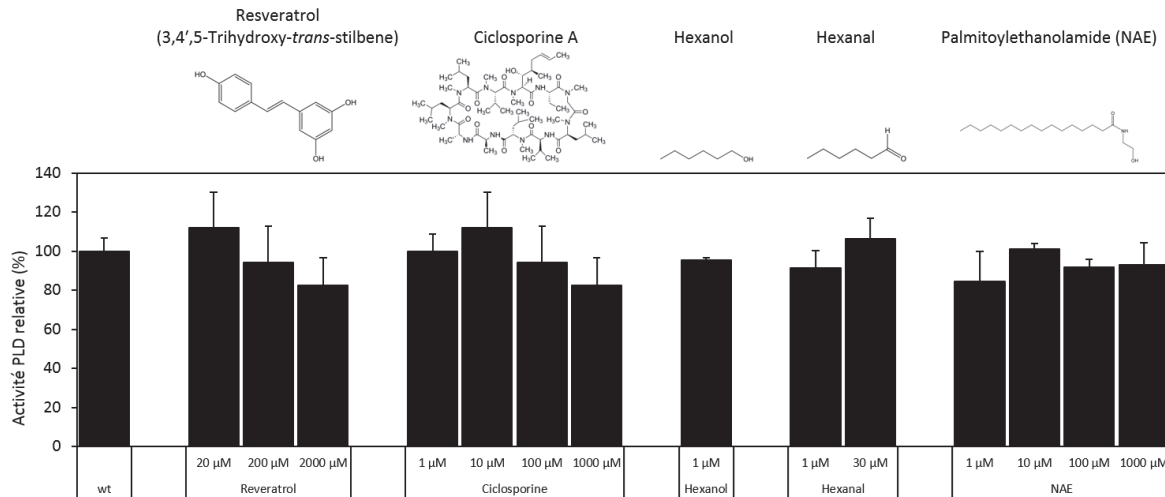


Figure 73 : Effets des inhibiteurs de PLD végétale connus sur *Vu*PLD.

3.2.3.1.3. Les inhibiteurs de la PLD humaine

Les inhibiteurs de la PLD humaine (cf. 1.3.3.9. Inhibiteurs des PLD) sont testés sur la PLD végétale. L'halopémide est un inhibiteur dual qui inhibe à la fois les isoformes 1 et 2 de la PLD humaine. Deux dérivés de l'halopémide ont disponibles commercialement : le CAY10593 inhibe préférentiellement la PLD1 et le CAY10954 inhibe préférentiellement la PLD2. Un quatrième dérivé de l'halopémide, le FIPI (5-fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide) est un aussi un inhibiteur dual classé parmi les plus puissants des PLD humaines (Figure 16). Aucune de ces quatre molécules n'inhibe l'activité *Vu*PLD (Figure 74), signifiant un mécanisme d'inhibition différent chez les deux types d'enzymes (humaine et végétale).

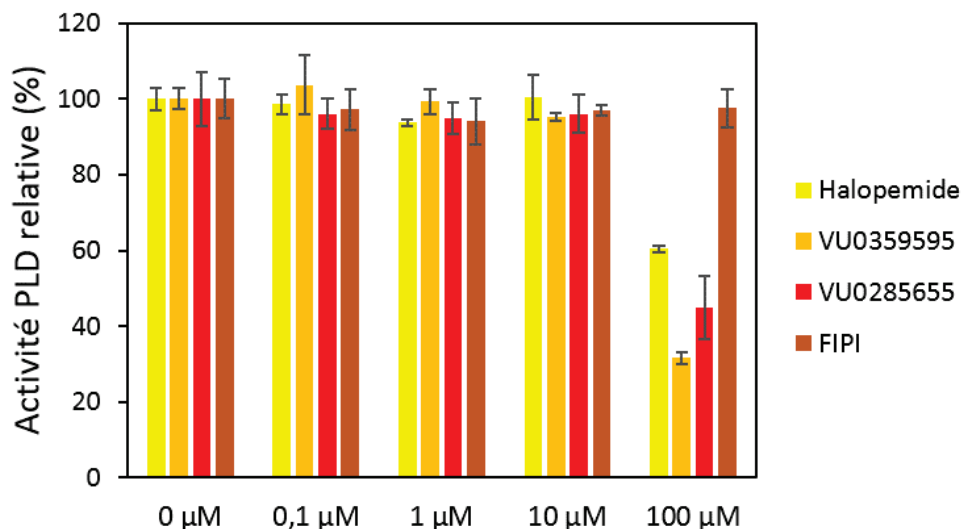


Figure 74 : Activité relative de la *Vu*PLD en présence des inhibiteurs connus des PLD1 et 2 humaines.

3.2.3.2. Criblage de la chimiothèque de l'ICBMS

3.2.3.2.1. Méthodologie de criblage

La chimiothèque de l'Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) contient 3120 molécules uniques (c'est-à-dire non présentes dans les chimiothèques disponibles commercialement), diverses par leurs structures (quinolones, indoles, indolinones, benzofuranes, coumarines, flavonoïdes, etc) et leurs origines (laboratoires de chimie et de pharmacie). Cette librairie de composés est principalement alimentée par des chercheurs de l'institut.

Le test enzymatique utilisé est un test qui détecte l'activité PLD par augmentation de la fluorescence par chélation, un phénomène aussi appelé CHEF (*CHelation Enhanced Fluorescence*) (Rahier et al., 2016b) (cf. 2.2.4.2.2. Dosage du PA).

Nous avons montré précédemment que ce test fonctionnait pour détecter une molécule inhibitrice comme le vanadate. Pour valider la faisabilité et la qualité de ce test enzymatique en vue d'effectuer un criblage de molécules, nous avons déterminé le facteur Z' . Ce facteur statistique permet d'évaluer la fenêtre de discrimination entre les faux positifs et faux négatifs d'un test enzymatique. En réalisant une série de 30 contrôles positifs ($VuPLD + DMSO 3\%$) et de 30 contrôles négatifs ($VuPLD + Vanadate 100\ \mu M$), nous calculons le facteur Z' dont la formule est le ratio de la différence de 3 écarts-type de contrôles positifs avec trois écarts-types de contrôles négatifs sur la différence des moyennes de chaque échantillon. Dans notre cas le facteur Z' est égal à 0,83. Ceci nous indique que le test enzymatique utilisant la 8-HQ se place dans la catégorie des très bons tests pour le criblage à haut débit (valeur du facteur Z' compris entre 0,5 et 1) (Zhang et al., 1999).

Le déroulement du criblage est représenté en Figure 75. Un premier criblage de l'ensemble des 3120 molécules a été effectué et a permis de déterminer 277 molécules pour lesquelles l'activité enzymatique est inférieure à 50 % de celle du contrôle positif. On peut postuler que certaines molécules interfèrent avec la fluorescence émise par la 8-HQ en diminuant l'intensité par effet d'écran. Ainsi, la diminution observée n'est pas le fait de l'inhibition de l'enzyme entraînant une diminution de la formation de PA. Ces molécules constituent donc des faux positifs que nous pouvons discriminer en utilisant un autre test, comme le test chromogénique. Ce test mesure la choline libérée qui est oxydée par une choline oxydase ; une peroxydase catalyse alors l'oxydation de deux chromophores (cf. 2.2.4.1. Test chromogénique). Nous avons testé

les 277 molécules trouvées et seulement 11 ont un effet inhibiteur confirmé. Ce résultat s'explique par le nombre important de molécules aromatiques et donc potentiellement fluorescentes présentes dans la chimiothèque. Ces 11 molécules sont de nouveau testées cette fois-ci en triplicat au test 8-HQ ce qui permet d'exclure huit molécules non inhibitrices. Il se trouve en effet que le criblage de la chimiothèque est effectué en singulet et non en triplicat pour d'évidentes raisons d'efficacité et de coût : ainsi de faux positifs ont pu apparaître. Il est utile ici de préciser que les molécules exclues ne le sont que parce qu'elles ne remplissent pas les critères inhérents aux tests enzymatiques que nous utilisons. Le fait est que si ces molécules inhibent l'activité PLD, nos conditions ne nous permettent pas forcément de les identifier. Les trois molécules restantes sont testées à différentes concentrations en triplicat et seulement l'une d'entre elles, que nous nommerons KBY7, s'avère être un inhibiteur exploitable avec une IC_{50} de 4 μ M (Figure 76B).

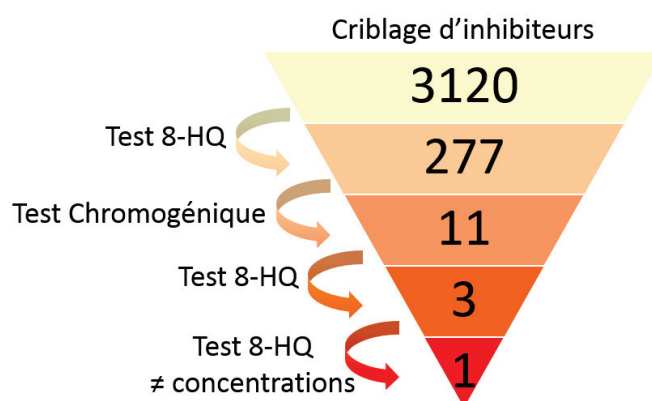


Figure 75 : Déroulement du criblage d'inhibiteur

3.2.3.2.2. Caractérisation de KBY7

L'inhibiteur de *Vu*PLD KBY7 mis au jour est testé dans différentes conditions. Tout d'abord comme nous le rapportions précédemment, celui-ci ne possède pas d'effet sur le phénomène de fluorescence (Figure 76B).

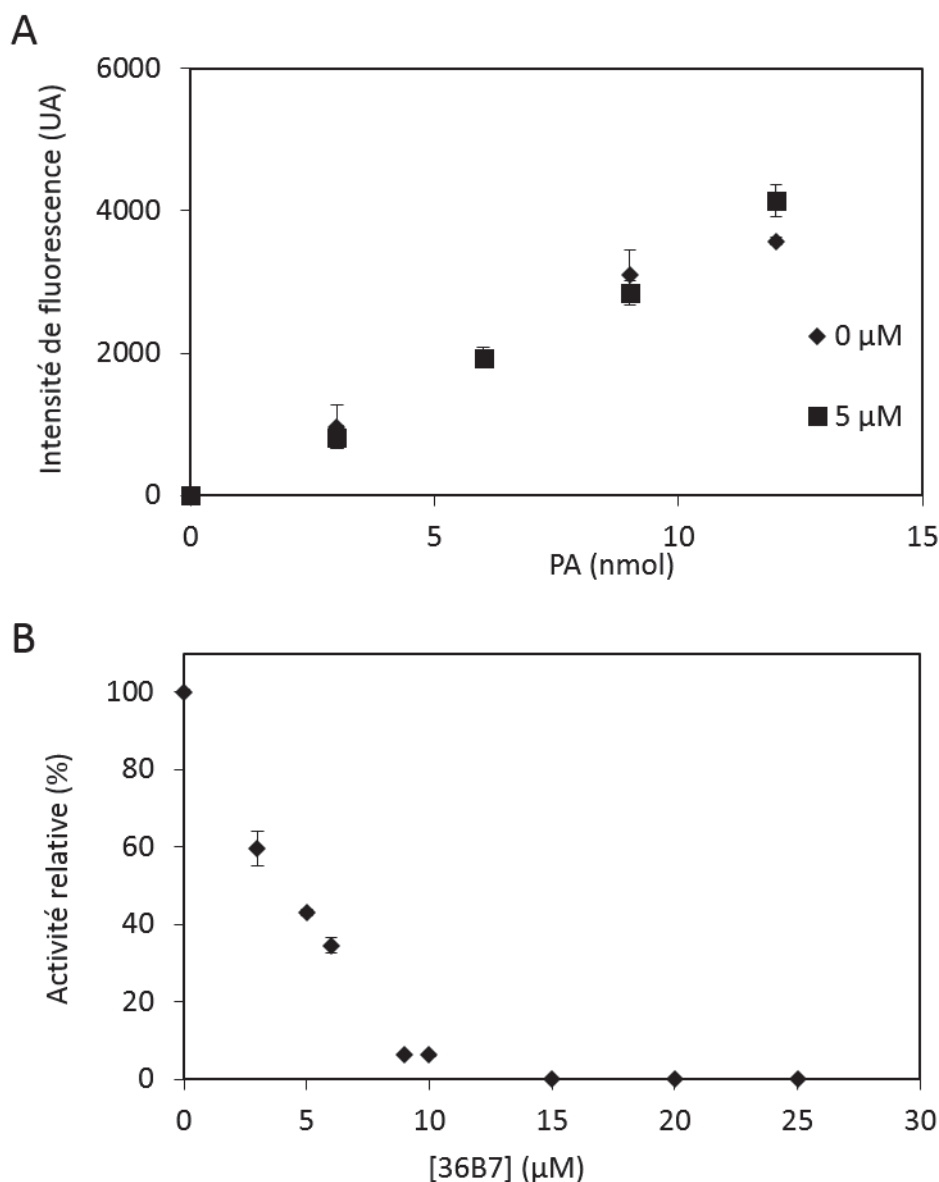


Figure 76 : Caractérisation de l'inhibiteur KBY7.

A) Effet de KBY7 sur une gamme étalon de PA en présence de 8-HQ en absence (0 μM) ou en présence (5 μM) de KBY7. B) Effet de doses croissantes de KBY7 sur l'activité PLD.

Le composé KBY7 a été testé sur plusieurs types de PLD végétales. En présence de KBY7 (10 μM), l'activité catalytique de la *Vu*PLD et la PLD de cacahuète (*Ah*PLD, *Arachis hypogaea*) est réduite par plus de 90% (Figure 77). Le KBY7 à cette même concentration diminue l'activité de la PLD de chou (*Bo*PLD, *Brassica oleracea*) d'environ 60% (Figure 77). L'inhibition de ces

trois PLD par le KBY7 a été testé avec des enzymes purifiées mais l'inhibiteur fonctionne aussi sur un extrait brut de protéines solubles d'une souche de *P. pastoris* exprimant la *Vu*PLD et une souche exprimant la PLD d'*A. thaliana*. Ainsi, le KBY7 peut être décrit comme un inhibiteur de PLD végétales en général.

Par ailleurs, KBY7 n'a aucun effet significatif sur les PLD qui ne contiennent pas de motif HKD telles que la PLD commerciale de *Streptomyces chromofuscus* (ScPLD) et la PLD de *Loxosceles gaucho* (araignée) (LgPLD) exprimée de façon recombinante dans *E. coli* (Figure 77) qui possède une activité sphingomyélinase D (Magalhães et al., 2013). Ces deux dernières enzymes ne partagent aucun aspect commun avec les enzymes de la superfamille des PLD.

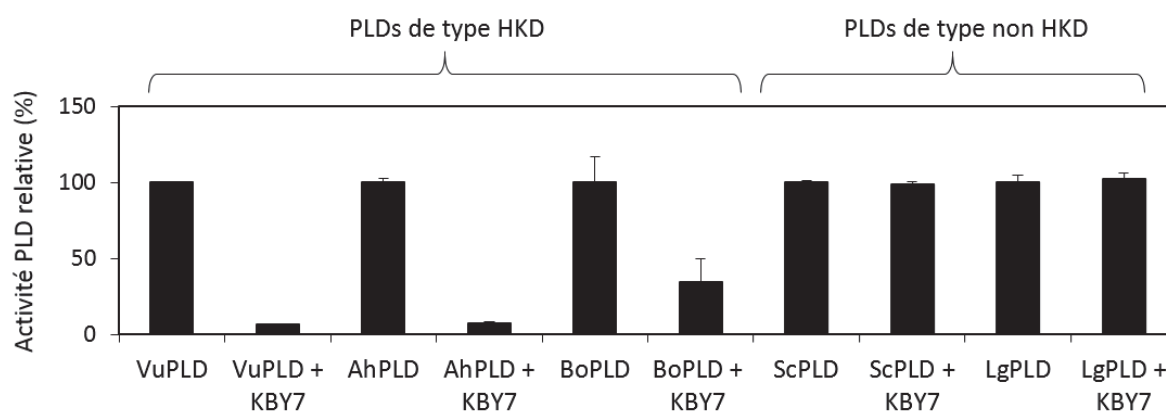


Figure 77 : Effet de l'inhibiteur KBY7 sur l'activité enzymatique de différentes PLD.

*Vu*PLD : PLD de *Vigna unguiculata*. *Ah*PLD : PLD d'*Arachis hypogaea*. *Bo*PLD : PLD de *Brassica oleracea*. *Sc*PLD : *Streptomyces chromofuscus*. *Lg*PLD : *Loxosceles gaucho*.

3.2.3.2.3. Effet de l'inhibiteur KBY7 sur l'activité enzymatique des PLDs humaines

Nous avons ensuite testé l'action de l'inhibiteur KBY7 sur la PLD humaine. Pour cela nous avons utilisé une lignée de cellules cancéreuses prostatiques PC-3. Tout d'abord, des tests de toxicité de la molécule et de viabilité (cf. 2.1.2.2. Test de toxicité et 2.1.2.3. Test de viabilité) des cellules ont été réalisés au laboratoire et n'ont montré aucun effet toxique ou délétère de la molécule sur les cellules (Figure 78A et B).

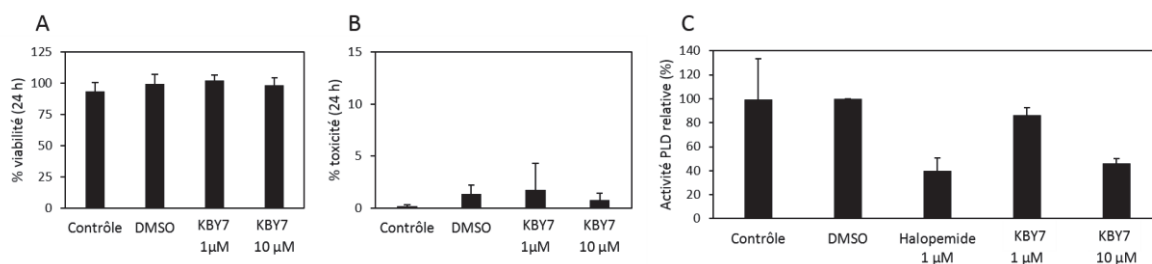


Figure 78 : Effet de la molécule KBY7 sur l'activité PLD humaine de cellules cancéreuses prostatiques A) Test de viabilité. B) Test de toxicité. C) Activité PLD relative rapportée à 100 % du contrôle avec comme témoin d'inhibition de la PLD humaine l'halopémide à 1 μM.

D'après la Figure 78C, on note que le KBY7 à 10 μM diminue l'activité de la PLD des cellules cancéreuses prostatiques d'environ 60 %, démontrant ainsi son action sur les PLD humaines à une faible concentration. Cette inhibition est à mettre en parallèle avec l'inhibiteur connu et caractérisé des PLD humaines qu'est l'halopémide dont on note ici, à 1 μM, une inhibition équivalente (Figure 25C).

De ces résultats reproduits à trois reprises nous pouvons affirmer que le KBY7 inhibe aussi les PLD humaines (PLD1 et/ou PLD2) renforçant ainsi l'hypothèse que cet inhibiteur est dirigé vers les PLD à motif HKD.

3.2.3.2.4. Analyse du KBY7 par spectrométrie de masse

Nous avons synthétisé ce composé pour avoir plus de matériel, le stock présent dans la chimiothèque étant quasiment épuisé. Cependant, la synthèse de ce composé telle qu'elle est décrite utilise des composés explosifs (Haouas et al., 2015). Ainsi, une autre voie de synthèse a été mise au point par Arnaud Comte, responsable de la chimiothèque de l'institut. Cependant, la molécule synthétisée qui est en tous points identique (selon les spectres RMN) à celle d'origine présente dans la chimiothèque n'a montré aucun effet inhibiteur sur la PLD végétale. Cela signifie qu'il existe probablement un contaminant présent dans le composé de la chimiothèque.

Deux hypothèses sont alors possibles :

- la molécule KBY7 subit une dégradation due au temps et/ou au solvant (DMSO) dans lequel elle est conservée ;
- il existe un contaminant présent dans le stock de la chimiothèque inhibant la PLD, contaminant absent lors de la synthèse du nouveau lot.

Nous avons testé la première hypothèse en essayant de dégrader artificiellement la molécule nouvellement synthétisée en chauffant pendant 7 h à 60 °C le composé dans le DMSO deutéré

ou bien encore en la saponifiant car cette molécule possède une fonction lactone saponifiable. Aucune de ses opérations n'a permis de retrouver l'inhibition du composé KBY7. Nous nous sommes donc penchés sur la deuxième hypothèse.

Nous avons donc cherché à identifier ce contaminant par spectrométrie de masse (Figure 79). En comparant les spectres du composé nouvellement synthétisé par A. Comte et du composé présent initialement dans la chimiothèque, nous avons pu observer que les profils étaient différents (Figure 79).

Des phtalates récupérées au cours de la synthèse sont présents dans les deux échantillons (Figure 79A et B). Nous avons ainsi pu déterminer cinq éléments « contaminants » susceptibles d'être responsables de l'inhibition de la PLD (flèches rouges Figure 79B).

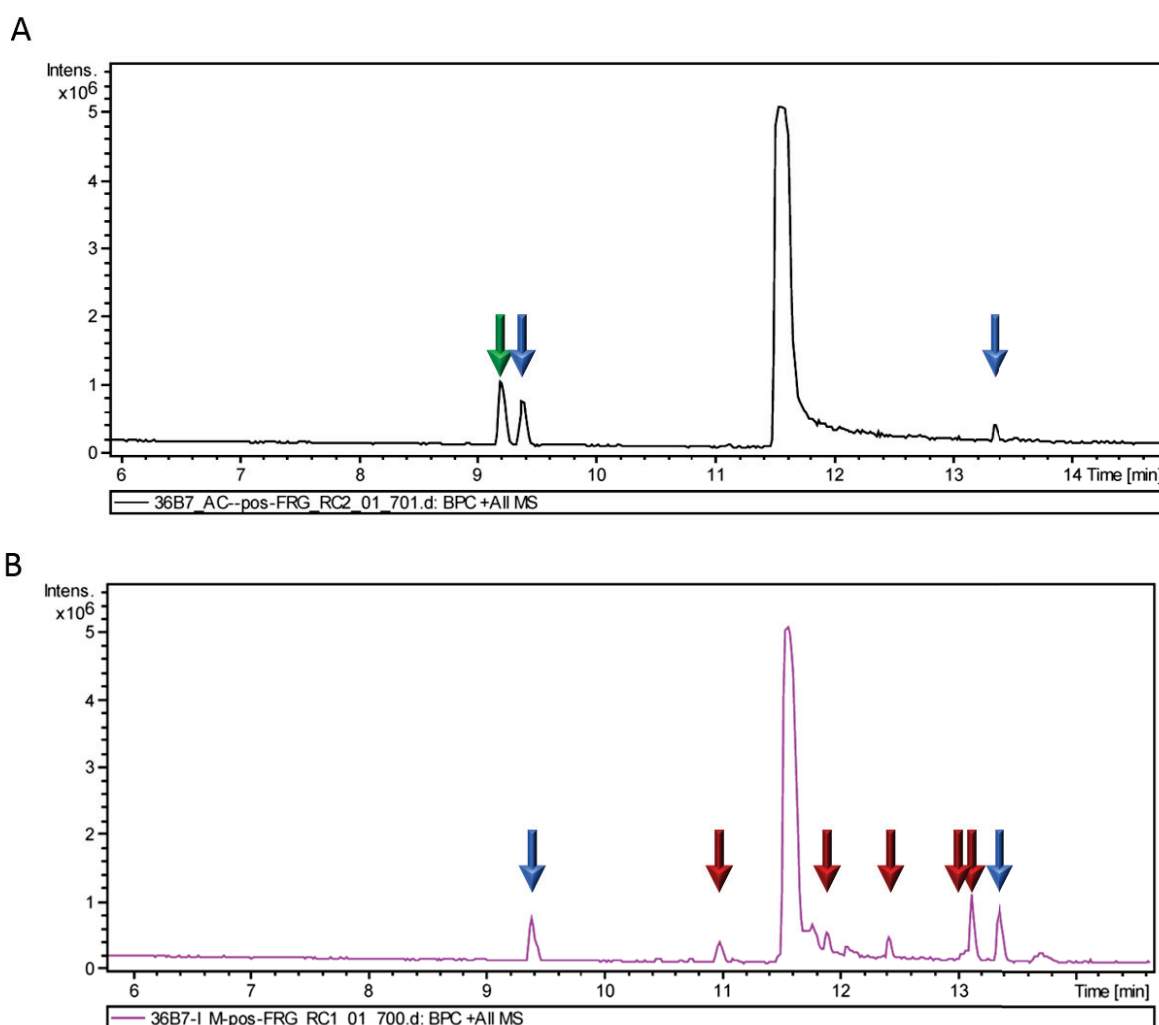


Figure 79 : Analyse par spectrométrie de masse des deux lots de composé KBY7.

A) Analyse du nouveau composé synthétisé par A. Comte. B) Analyse du composé du lot d'origine. Les flèches rouges indiquent les pics supplémentaires pour KBY7, la flèche verte indique un composé supplémentaire dans la préparation de la chimiothèque, les flèches bleues indiquent un composé commun entre les deux synthèses.

Ces cinq éléments ont la composition chimique suivante :

- A $t = 11,0$ min, $C_{16}H_{23}O_4$ ou $C_{16}H_{22}O_4$ ou $C_{32}H_{44}O_8$
- A $t = 11,9$ min, $C_{28}H_{34}$
- A $t = 12,4$ min, $C_{30}H_{29}N_2O_5$
- A $t = 13,0$ min, $C_{31}H_{40}$
- A $t = 13,1$ min, $C_{22}H_{43}O_4$

On note que les molécules aux temps de rétention $t = 11,9$ min et $t = 13,0$ min sont des composés hydrophobes.

Afin d'identifier quel pic contient l'inhibiteur de *Vu*PLD, nous avons recommencé la séparation chromatographique identique à celle effectuée en spectrométrie de masse en utilisant une colonne biphényle (Figure 80). Toutefois, au cours de cette nouvelle séparation les temps de rétention des différents pics sont différents par rapport au chromatogramme obtenu en spectrométrie de masse ne nous permettant pas d'identifier la nature de chaque pic.

Nous avons tout d'abord cherché à contrôler si la molécule responsable de l'inhibition sortait de la colonne et ne restait pas adsorbée sur le biphényle. Ainsi, nous avons collecté la totalité de l'éluat, concentré puis repris dans 5 μ L de DMSO pour le tester. Il s'avère alors que l'on retrouve l'inhibition ce qui prouve que l'inhibiteur est bien élué de la colonne. Dans un second temps nous avons fractionné en trois parts égales l'éluat en collectant de 0 à 7 minutes, de 7 à 14 minutes et enfin de 14 à 22 minutes. S'il a semblé lors de notre premier test que l'effet inhibiteur était plus important dans la troisième fraction (de 14 à 22 minutes), le triplicat de cette expérience n'a pas permis de confirmer ni d'infirmer ces résultats.

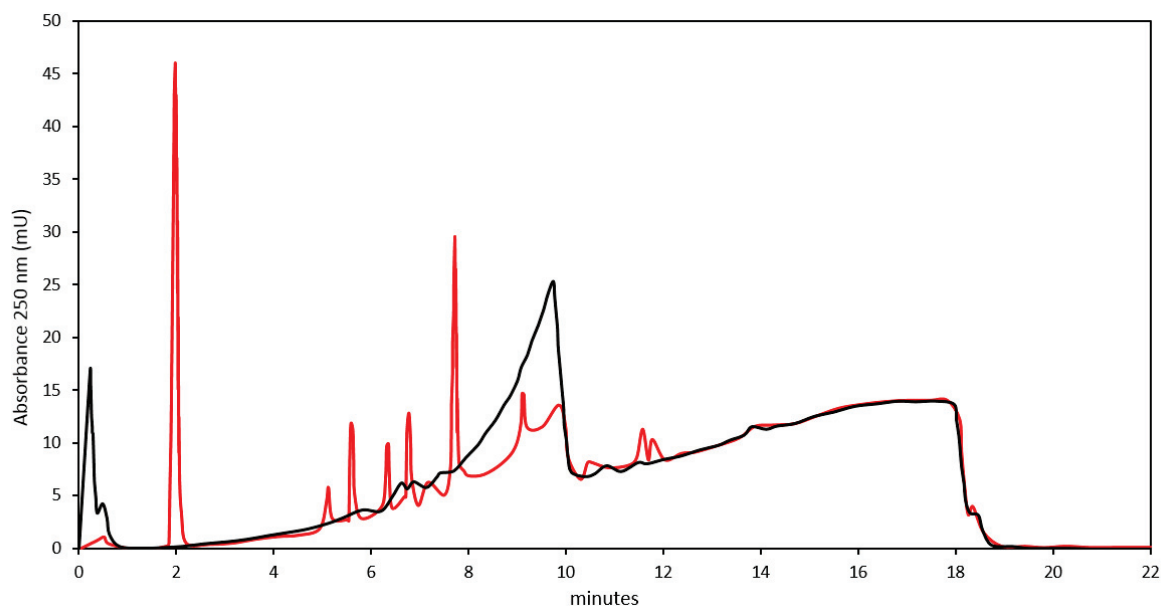


Figure 80 : Chromatogramme de séparation du composé KBY7 sur colonne Biphényle. En rouge, l'absorbance UV (250 nm) de la séparation du composé KBY7. En noir, l'absorbance UV (250 nm) de l'injection contrôle du méthanol.

À l'heure actuelle, nous essayons encore de tester l'effet inhibiteur des différentes fractions collectées pendant la séparation sur colonne biphényle.

3.2.3.3. Discussions

Comme précédemment montré dans le chapitre 1, la structure de la PLD végétale, si elle suit un repliement globalement identique à toutes les PLD, et notamment à celle des bactéries selon nos modèles, possède beaucoup plus de parties non structurées. Ces boucles doivent être définies car si l'activité enzymatique est concentrée au niveau du cœur HKD, le reste de la structure et notamment les boucles demeurent le lieu d'interaction avec le substrat, avec des partenaires, avec d'autres molécules activateurs, cofacteurs ou bien inhibiteurs.

Nous nous servons de la PLD végétale comme analogue de la PLD humaine pour cribler des inhibiteurs. Cela se justifie aisément par plusieurs points :

- nous utilisons une enzyme qui possède des caractéristiques structurales similaires et nous le prouvons avec nos travaux de structure. Cette enzyme possède par ailleurs des portions de séquences rigoureusement identiques à celles de la PLD humaine : le motif catalytique dupliqué, mais aussi d'autres portions parfaitement conservées. Notre étude de mutagenèse dirigée témoigne aussi de l'importance de ces séquences communes pour la catalyse ou pour encore la stabilité structurale de l'enzyme.

- nous utilisons la PLD végétale car c'est la seule PLD eucaryote à motifs HKD purifiée à homogénéité.

Nous avons montré l'efficacité de l'effet inhibiteur du phosphate, du vanadate et du tungstate sur l'activité PLD. Ces inhibiteurs connus qui miment le groupement phosphate des phospholipides bloquent probablement l'enzyme dans son intermédiaire covalent phosphatidyl-enzyme. Notons que le tungstate a été co-cristallisé avec la PLD de *Streptomyces sp.* PMF et se trouve localisé à proximité de l'histidine catalytique du premier motif. De même le tungstate et le vanadate ont été co-cristallisés avec la Tdp1 humaine (tyrosyl-DNA phosphodiesterase) une enzyme de la superfamille des PLD qui contient deux motifs HKD et qui est inhibée par ces molécules (Leiros et al., 2004). Nous avons aussi testé des dérivés du vanadate présentant une hydrophobicité croissante. Nous n'observons alors pas de différence d'inhibition, suggérant donc que la fixation de ces molécules peut s'effectuer sur plusieurs sites de l'enzyme et non pas uniquement dans le site catalytique dont la poche semble trop étroite pour intégrer les plus gros dérivés comme le vanadate triphenylsilyl.

Le resvératrol fait partie des inhibiteurs indirects de l'activité PLD, c'est-à-dire que l'on observe un effet de cette molécule *in vivo* mais pas *in vitro*, suggérant donc qu'elle n'inhibe pas directement la PLD (Selvy et al., 2011). La ciclosporine A (Figure 73), de son côté, a été montrée comme inhibiteur de l'activité de transphosphatidylation de la PLD de chou (Madhesh and Balasubramanian, 1998). Cette mesure est effectuée sur une enzyme partiellement purifiée selon le protocole établi par Flora Davidson en 1958 (Davidson and Long, 1958). Dans notre cas, aucune de ces deux molécules dont l'effet inhibiteur sur les PLD végétales est connu n'inhibe l'activité de *Vu*PLD. De même, deux groupes canadiens a montré l'effet de l'hexanal et de l'hexanol sur l'activité PLD d'un extrait de maïs (Paliyath et al., 1999) et de tomate (Tiwari and Paliyath, 2011) et plus récemment sur un extrait brut de framboise (Kayal et al., 2017). Ces deux dernières molécules n'inhibent pas non plus l'activité enzymatique de *Vu*PLD. Enfin, l'effet inhibiteur des N-acetyl-éthanolamines (NAE) est connu sur les PLD végétales où les chaînes de 12, 14, 16 (Figure 73) et 18 carbones ont une IC_{50} respectivement de 0,15 μ M, 0,15 μ M, 5 μ M et 10 μ M (Austin-Brown and Chapman, 2002). Dans notre cas, le NAE C16:0 n'a pas d'effet inhibiteur. Il se trouve que les auteurs de l'étude (Austin-Brown and Chapman, 2002) testent les NAE sur des PLD recombinantes de ricin et d'*A. thaliana* et sur les PLD commerciales de *Streptomyces chromofuscus* et de chou. Pour le ricin et *A. thaliana* les enzymes sont exprimées dans *E. coli* et le NAE est testé sur un lysat cellulaire plutôt que sur

une enzyme purifiée. Dans ce cas précis, ils observent une inhibition avec les NAE. À l'inverse, ils n'observent pas d'inhibition chez *S. chromofuscus* qui, pour rappel, ne possède pas de motifs HKD. Enfin, ils observent un effet des NAE sur la PLD de chou commerciale, mais on sait que le niveau de pureté de cette enzyme est faible (75 % d'impuretés) et son activité catalytique bien en deçà des niveaux mesurés au laboratoire. Ainsi, les conditions sont différentes des nôtres pour lesquelles nous utilisons une enzyme purifiée à homogénéité.

L'halopémide a été découvert au cours d'un criblage haut débit comme inhibiteur de l'activité PLD2 humaine (Monovich et al., 2007). En réalité, c'est un inhibiteur dual qui inhibe à la fois les isoformes 1 ($IC_{50} = 220$ nM) et 2 ($IC_{50} = 310$ nM) de la PLD humaine. Deux dérivés de l'halopémide ont été synthétisés de façon à accroître la spécificité de la molécule envers un isoforme particulier. Le CAY10593 inhibe préférentiellement la PLD1 ($IC_{50} = 11$ nM) et le CAY10954 inhibe préférentiellement la PLD2 ($IC_{50} = 100$ nM) (Lewis et al., 2009). Le FIPI (5-fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide), un autre dérivé de l'halopémide, bloque notamment le chimiotactisme des cellules (Su et al., 2009). De fait, c'est un des inhibiteurs les plus puissants de la PLD1 ($IC_{50} = 9.5$ nM) et de la PLD2 ($IC_{50} = 17$ nM) (Figure 16). L'absence d'effet inhibiteur de ces molécules sur la PLD végétale signifie probablement qu'elles se fixent sur un site qui n'est pas commun aux PLD végétales et humaines. Il peut s'agir des boucles non structurées dont les séquences divergent de celles des PLD de plantes ou bien des domaines régulateurs PX et PH.

Ces données préliminaires au criblage de la chimiothèque remettent en question ce qui est établi dans la littérature à la fois sur le mode d'inhibition des inhibiteurs de la PLD humaines (Ganesan et al., 2015) et sur les inhibiteurs décrits des PLD végétales.

A l'issue du criblage de la chimiothèque, le composé KBY7 présente un puissant effet inhibiteur avec une IC_{50} de l'ordre du μ M. La synthèse du composé KBY7 est décrite par l'équipe tunisienne de Moncef Msaddek (Haouas et al., 2015). En effectuant une synthèse dérivée de ce composé aboutissant à la même molécule nous identifions cinq contaminant présent dans le composé d'origine inhibant la PLD. L'identification de l'inhibiteur de la PLD parmi ces cinq contaminants est en cours. Nos résultats tendent à montrer que cette molécule n'est pas un sous-produit de la dégradation de KBY7 il pourrait dès lors être une molécule dérivée d'un des produits utilisé pour la synthèse et la séparation des différentes molécules nous permettra d'identifier l'inhibiteur.

3.2.3.4. Conclusions & perspectives

Au cours de ces travaux, nous avons testé dans un premier temps les inhibiteurs connus des PLD.

Ceci nous a permis de supposer que les inhibiteurs de la PLD humaine ne se fixent pas sur des portions de séquences communes aux PLD du vivant car ils n'inhibent pas la PLD végétale. Il faudrait alors tester ces inhibiteurs sur la PLD ζ végétales, une enzyme possédant les domaines PX et PH (comme la PLD humaine) à la place du domaine C2.

Beaucoup d'inhibiteurs de PLD végétales ont été décrits dans la littérature en testant leur effet sur un extrait brut de protéine contenant de l'activité PLD. Ceux-ci n'ont pas d'effets quand nous les testons sur une enzyme pure. C'est compréhensible pour le resvératrol, dont il est montré qu'il n'inhibe pas directement l'enzyme. Pour la cyclosporine A ou encore pour l'hexanal ou l'hexanol, ces molécules sont testées sur une enzyme partiellement purifiée selon un protocole daté et on ne connaît pas le niveau de pureté. De même pour le NAE dont l'action est directement montrée sur l'isoforme α des PLD végétales. Ici encore, l'inhibiteur est testé sur un lysat cellulaire brut ou bien une enzyme à la pureté très relative. Sur cet aspect qui discute les données de la littérature nous pourrions varier les NAE et notamment la taille de la chaîne acyle de ceux-ci. De la même façon nous pourrions tester tous les alcools primaires selon la longueur de leur chaîne carbonée. De fait, on sait que l'éthanol et le butanol ont un effet inhibiteur de l'activité hydrolase. Ce n'est pas le cas du méthanol mais aucune donnée n'existe quant aux autres alcools primaires.

Le criblage effectué au cours de ces travaux est inédit, dans le sens où il propose d'utiliser une enzyme à motif HKD eucaryote pure. Nous avons identifié KBY7 comme un inhibiteur puissant de *Vu*PLD avec une IC₅₀ de 4 μ M.

Nous montrons avec ces travaux de criblage que l'inhibiteur KBY7 inhibe toutes les PLD à motif HKD, qu'elles soient d'origine végétale ou animale. On note en effet une action inhibitrice de l'activité PLD sur une lignée cellulaire de cancer de la prostate PC-3 indiquant que notre inhibiteur criblé, KBY7, fonctionne aussi sur la PLD humaine. Par ailleurs, des tests sont en cours pour tester une PLD bactérienne à motif HKD. À l'inverse, nous montrons que cet inhibiteur est inefficace sur des PLD sans motif HKD.

Un écueil majeur demeure. La synthèse par une voie différente de celle publiée pour la molécule KBY7 ne donne pas lieu à une inhibition de l'activité PLD, ce qui signifie que la molécule

provenant de la chimiothèque contient une impureté qu'il nous reste à identifier et à caractériser. Cette impureté provient probablement d'un sous-produit issu de la synthèse. Ainsi, la reproduction exacte de la voie de synthèse publiée pourrait amener à reproduire la molécule inhibitrice et ainsi confirmer cette hypothèse.

Si tel devait être le cas et étant donné que le mélange KBY7 a une IC_{50} de 4 μ M et que le contaminant représente moins de 20 % du spectre UV en spectrométrie de masse il semblerait qu'une telle molécule aurait un pouvoir inhibiteur encore plus important, ce qui la classerait parmi les meilleurs inhibiteurs des PLD connus à ce jour.

3.3. Chapitre 3 : La PLD dans un contexte métabolique

3.3.1. Clonage et caractérisation biochimique d'une PLD de microalgue verte

3.3.1.1. Analyse in silico de la PLD de *Coccomyxa subellipsoidea*

Coccomyxa subellipsoidea C-169 est une microalgue verte unicellulaire non-motile allongée dont la taille varie de 3 à 9 μm . Elle a été isolée en 1959-1960 à *Marble Point* en Antarctique à partir de tourbe séchée (Holm-Hansen, 1964). En réalité, le type *C. subellipsoidea* avait déjà été découvert au début du 20^{ème} siècle en Angleterre et en Irlande, elle forme alors une incrustation gélatineuse dans les mousses et les rochers. Des espèces sont connues pour former du lichen avec certains basidiomycètes, des symbiotes intracellulaires de Ginkgo ou encore des parasites intracellulaires de moules (Blanc et al., 2012).

Au cours du criblage de séquences de PLD végétales (Figure 22) réalisé dans ce travail de thèse, si plusieurs PLD d'algues ressortent, une seule répond à nos critères de sélection (cf. 2.2.1.1. Recherche de séquences). Il s'agit de la séquence de la PLD de *C. subellipsoidea*. L'alignement de cette séquence avec la séquence de la PLD d'*A. thaliana*, notre modèle d'étude, indique que les quatre motifs spécifiques aux PLD décrits par Ponting et Kerr en 1996 (Ponting and Kerr, 1996) sont présents (Figure 81), témoignant qu'il s'agit bien ici d'une séquence de PLD. D'autre part, cette séquence d'algue répondant à nos critères de sélection, ceci nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'une PLD α végétale possédant un domaine C2 en N-terminal.



Figure 81 : Alignement des séquences protéiques de CsPLD et d'AtPLD.

Les quatre motifs spécifiques dupliqués sont indiqués en jaune, vert, rouge et bleu. Les huit séquences spécifiques des PLD α (cf. 2.2.1.1. Recherche de séquences) sont indiquées en gras souligné.

On note quatre différences majeures entre ces deux séquences, outre les petites insertions de quelques résidus :

- tout d'abord comme le notaient Beligni *et al.* (Beligni et al., 2015), le motif HKD N-terminal est un motif HKS, un motif jamais retrouvé parmi les 209 séquences que nous avons sélectionnées ;
- l'AtPLD semble posséder un peptide supplémentaire de 36 résidus en N-terminal ;
- un autre peptide supplémentaire de 10 résidus chez *A. thaliana* est en position 701 ;
- en position 412 un peptide supplémentaire de 10 résidus existe chez l'algue.

Ces deux séquences protéiques ont une identité de 43,6 %, ce qui place la séquence de la CsPLD comme étant la plus éloignée de celles que nous avons trouvées en base de données par rapport à la séquence modèle d'AtPLD (Figure 22).

3.3.1.2. Clonage et expression de CsPLD

La PLD participe à la voie de synthèse des TG (Figure 86) en produisant un des principaux précurseurs, le PA. Nous décrivons en Introduction (cf. 1.4. Le métabolisme lipidique chez les algues) l'importance de l'accumulation des TG chez les algues et l'application directe de leur extraction dans la perspective de fabrication de biodiesels.

Ainsi, le clonage d'une PLD d'algue est une opportunité unique pour caractériser ces enzymes au niveau biochimique et structural afin, à terme, de potentiellement optimiser la production de biodiesel à l'échelle industrielle à partir des TG d'algues et de ces enzymes recombinantes.

3.3.1.2.1. Analyse de l'ARN messenger

Les ARN messagers des cellules d'algue en cultures sont extraits et rétrotranscrits en ADN codants par deux méthodes (cf. 2.1.3.6.2. RT-PCR) :

- la méthode des « random hexamer » repose sur l'utilisation d'amorces composées aléatoirement de 6 nucléotides
- la méthode des amorces polyT composées uniquement de thymine pour se fixer sur la queue polyA des ARN messagers.

L'analyse de la séquence des ARNm extrait correspondant à la PLD indique que la séquence contenue dans la base de données NCBI comporte des erreurs :

- deux exons sont manquants en N-terminal (peptide de 36 résidus) et en C-terminal (peptide de 10 résidus)
- le premier motif catalytique est bien un motif HKD et non HKS comme le laisse penser un épissage alternatif mal effectué.

Nous avons donc trouvé dans l'ARNm la séquence correcte HKD du motif catalytique et dans le génome de l'algue nous avons pu déterminer de fait, qu'il s'agissait bien d'une erreur d'épissage en base de données. De plus, les CBR (*Calcium Binding Region*) du domaine C2 sont bien alignés même s'il manque l'asparagine responsable de la fixation d'ions calcium dans le CBR2 de *CsPLD*. Cependant, certains domaines C2 (comme celui de la PKC β par exemple) ne possèdent pas non plus ce résidu (Rahier et al., 2016a) (Figure 82).

En termes d'identité de séquence, la séquence que nous clonons partage 44,6 % d'identité avec celle d'*A. thaliana* alors que la séquence théorique contenue en base de données n'en partage que 43,6 %.

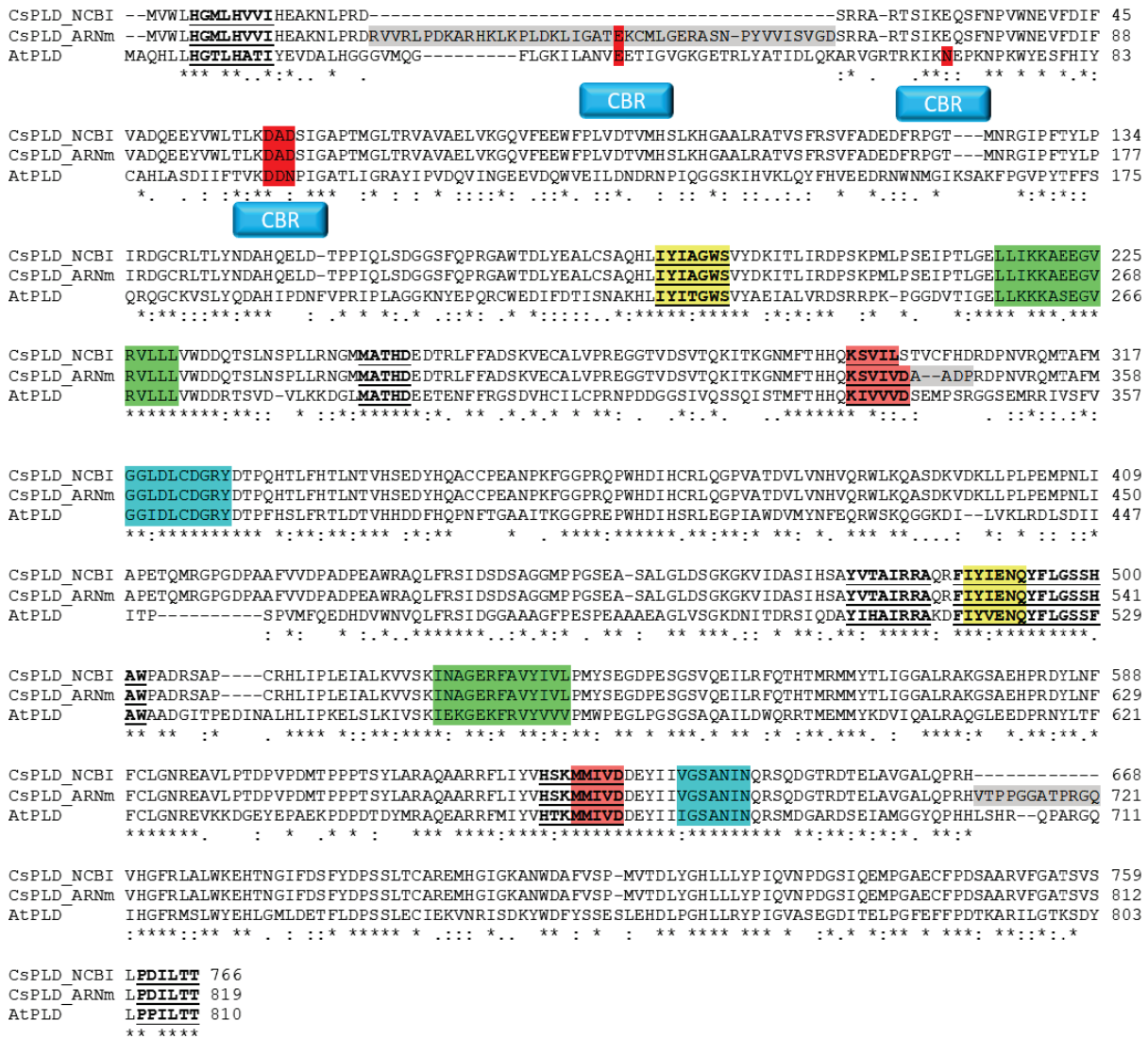


Figure 82 : Alignement des séquences protéiques de CsPLD (théorique et expérimentale) et d’AtPLD. CsPLD_NCBI : séquence de la CsPLD présente en base de données ; CsPLD_ARNm : séquence déterminée à partir du clonage de l’ARNm.

Les quatre motifs spécifiques dupliqués sont indiqués en jaune, vert, rouge et bleu. Les huit séquences spécifiques des PLD α (cf. 2.2.1.1. Recherche de séquences) sont indiquées en gras souligné. Les portions de séquence en gris indiquent les différences entre la séquence théorique et la séquence expérimentale. Les CBR (*calcium binding region*) sont indiqués et les résidus qui fixent le calcium sont surlignés en rouge (selon Rahier et al., 2016).

3.3.1.2.2. Clonage de la CsPLD dans le plasmide pGAPZB

L’ensemble des étapes de clonage est présenté en Figure 83 et Figure 84. Afin de caractériser cette enzyme nous avons entrepris son clonage dans le système d’expression *P. pastoris*, système d’expression fructueux pour l’expression des PLD végétales (Ben Ali et al., 2007; Rahier et al., 2016a).

A partir des ARNm, nous avons tout d'abord essayé d'amplifier le gène entier avec des amorces flanquantes comportant les sites de restriction (*EcoRI* en 5' et *NotI* en 3') pour le clonage dans le plasmide pGAPZB. Que ce soit avec la polymérase KOD ou la polymérase Q5, il n'y a pas eu de bande amplifiée visible sur gel d'agarose. Seule la *Taq polymerase* a permis d'amplifier un fragment à 2500 pb (taille attendue pour le gène). Cependant, beaucoup d'amplification aspécifique subsiste. Le clonage à partir du fragment purifié par extraction sur gel n'a rien donné.

Nous avons donc essayé d'amplifier le gène de *CsPLD* en plusieurs morceaux. Trois morceaux ont été obtenus et ceux-ci ont été clonés dans le plasmide pGM[®]-T Easy (cf. 2.1.3.6.1.1. PCR chevauchante) (Figure 83B) puis séquencés.

Les fragments sont amplifiés par PCR puis incubés deux à deux afin de les ajouter bout à bout par la technique de PCR chevauchante ou SOEING (*Splicing by Overlap Extension*). Les fragments 2 et 3 de la partie 3' ont rapidement été reliés et clonés dans le pGM[®]-T Easy (pGMT-B) (Figure 83C) mais nous n'avons jamais pu relier les fragments 1 (1500pb) et 2+3 (900pb) par cette technique.

Nous avons donc utilisé la technique de clonage par enzyme de restriction. Le fragment 1 est amplifié par PCR avec des amorces comportant le site *EcoRI* en 5' et *NheI* en 3'. Le produit de PCR est cloné dans le plasmide pGM[®]-T Easy et séquencé (pGMT-A) (ci-dessous Figure 83D). Après digestion par l'enzyme *EcoRI* dont les sites entourent le fragment inséré dans le pGMT-A (un site sur le gène et un autre sur la plasmide), le fragment 1 est cloné dans le site unique *EcoRI* du plasmide pGAPZB (pGAPZB-A) (Figure 83E).

Le fragment B (2+3) est amplifié par PCR avec des amorces comportant les sites *NheI* en 5' et *NotI* en 3'. Le produit de PCR est cloné dans le plasmide pGM[®]-T Easy et séquencé (pGMT-B.1) (Figure 83D). Le fragment 3' de *CsPLD* contenu dans le plasmide pGMT-B.1 est digéré par les enzymes *NheI* et *NotI* et sous-cloné dans le plasmide pGAPZB-A avec les mêmes enzymes de restrictions. Ainsi, le plasmide résultant pGAPZB-*CsPLD*.1 contient le gène codant la *CsPLD* (Figure 83F).

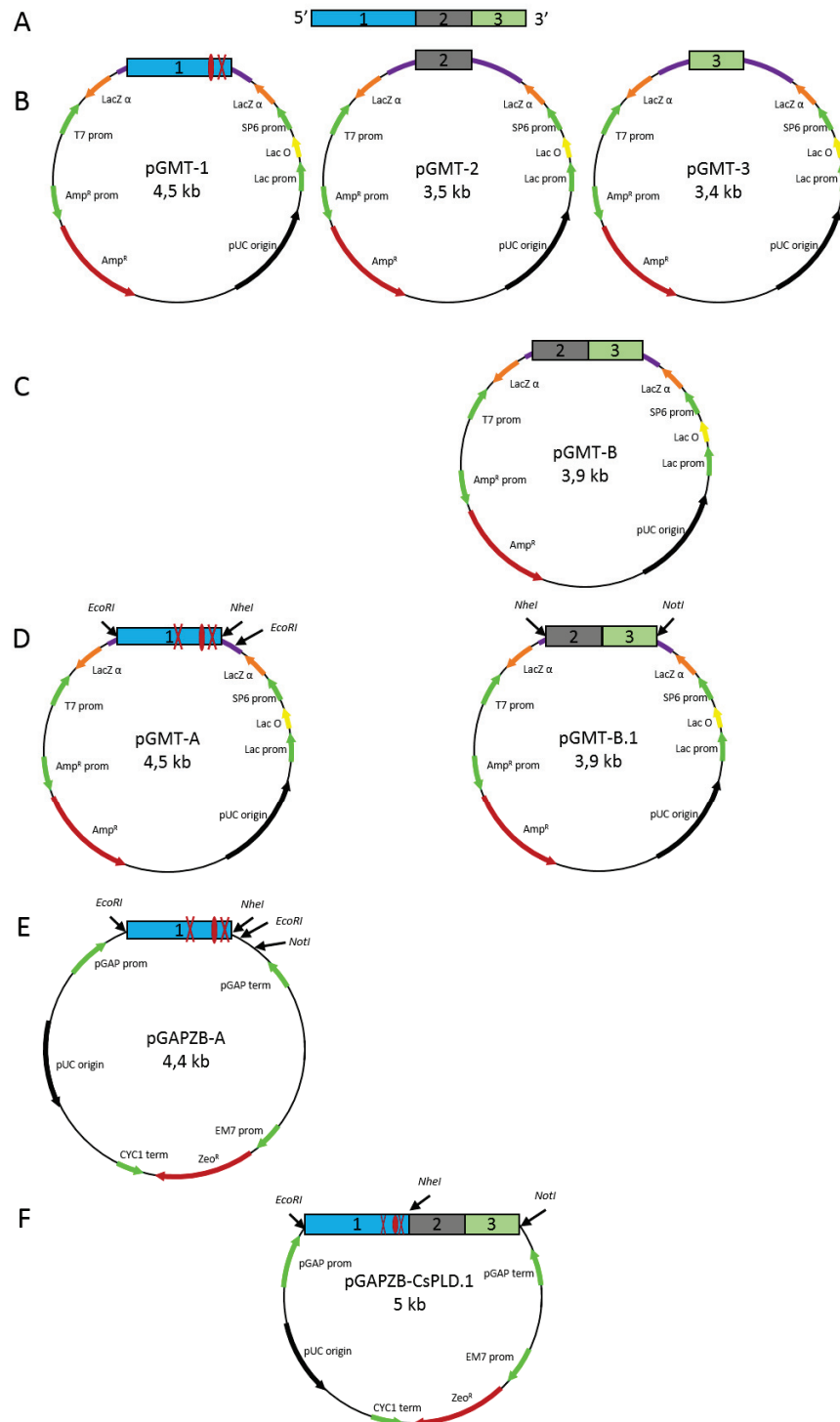


Figure 83 : Représentation schématique du clonage de la CsPLD dans le vecteur pGAPZB. A) La séquence est amplifiée à partir des ADNc totaux en trois parties respectivement de 1500 pb (bleu), 500 pb (gris) et 400 pb (vert). B) Chaque partie est clonée dans le plasmide pGM[®]-T Easy. C) Les fragments 2 et 3 sont fusionnés par SOEING. D) Le fragment 1 est amplifié par PCR avec des amorces ajoutant les sites de restriction EcoRI et NheI, le fragment 2+3 est amplifié par PCR avec des amorces ajoutant les sites de restriction NheI et NotI. E) Le fragment 1 est cloné dans le pGAPZB avec l'enzyme EcoRI. F) Le fragment 2+3 est ajouté à la suite du fragment 1 dans le pGAPZB-A en transférant avec les enzymes NheI et NotI. Les croix rouges représentent les mutations, le cercle rouge est la délétion.

Après analyse du séquençage des plasmides recombinants, si les fragments 2 et 3 constituant le fragment B correspondent parfaitement à la séquence théorique, le fragment 1 contient trois erreurs dans la séquence dues à l'utilisation de la *Taq polymerase* dénuée d'activité correctrice 3' 5'(Figure 83 et Figure 84A) :

- une mutation nucléotidique T1016A induit la mutation du résidu valinyl 339 en aspartyl (V339D)
- une délétion de la cytosine en position 1439 induit un décalage du cadre de lecture et l'apparition en aval d'un codon stop.
- une mutation de la thymine 1459 en cytosine induit le changement du résidu séryl 487 en prolyl (S487P).

Afin de supprimer la mutation T1016A (1^{ère} mutation), le fragment *NdeI/SphI* du plasmide pGMT-1 (Figure 83B) a été extrait et sous-cloné dans le pGAPZB-A en lieu et place du fragment *NdeI/SphI*. Ainsi, le plasmide résultant pGAPZB-A.1 ne contient que les deux dernières erreurs : la délétion et T1459C (Figure 84B).

Ces deux erreurs proches dans la séquence sont entourées des sites de restriction *ApaI* et *NheI* (*NheI* est un site ajouté par PCR et utilisé pour reliquer les deux fragments de *CsPLD*). Pour obtenir ce fragment sans délétion ni mutation, nous l'avons cloné à partir des ADN codant de *C. subellipsoidea* dans le plasmide pGM[®]-T Easy (pGMT-C) (Figure 84B). Le fragment *ApaI/NheI* est extrait et sous-cloné dans le plasmide pGAPZB-A.1. Le plasmide résultant pGAPZB-A.2 ne comporte alors plus aucune erreur (Figure 84C).

Le fragment 3' de *CsPLD* contenu dans le plasmide pGMT-B.1 est digéré par les enzymes *NheI/NotI* et sous-cloné dans le plasmide pGAPZB-A.2 avec les mêmes enzymes de restrictions. Le plasmide résultant pGAPZB-*CsPLD*.2 contient le gène codant la PLD de *C. subellipsoidea* sans mutation ni délétion (Figure 84D).

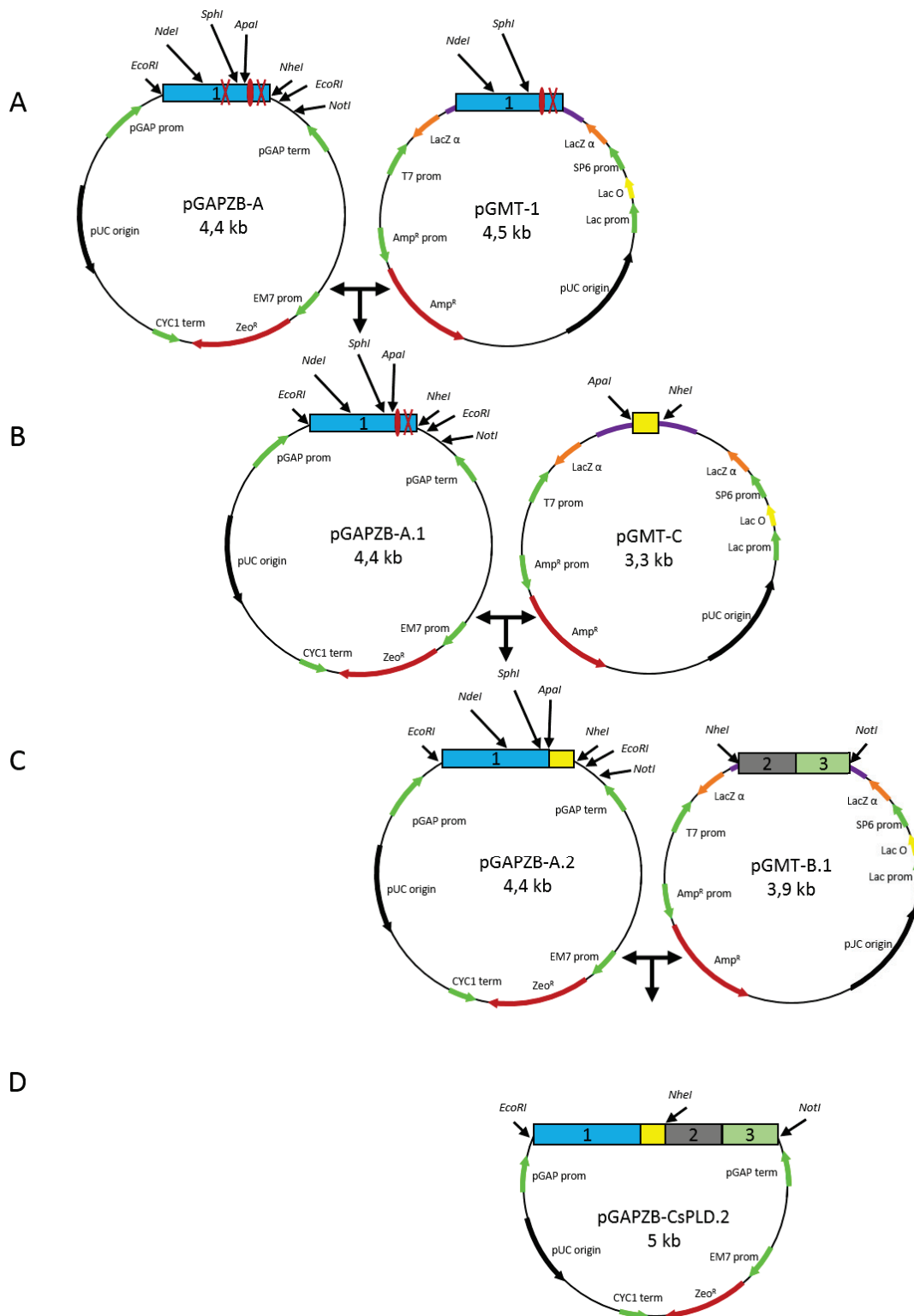


Figure 84 : Correction des mutations introduites par PCR au cours du clonage de la *CsPLD*.

A) La mutation T1016A est corrigée en remplaçant le fragment NdeI/SphI par celui du plasmide pGMT-1 (Figure 83A). B) Le fragment ApaI/NheI (300 pb) est cloné à partir des ARNm de *C. subellipsoidea* dans le pGM[®]-T Easy (en jaune). C) Le fragment ApaI/NheI est sous cloné dans le pGAPZB-A.1 dans les mêmes sites des restrictions pour retirer la délétion et la mutation T1459C. D) le fragment 2+3 est ajouté à la suite du fragment 1 dans le pGAPZB-A.2 en transférant le fragment digéré par les enzymes NheI et NotI. Les croix rouges représentent les mutations, le cercle rouge est la délétion.

3.3.1.2.3. Clonage de la CsPLD dans le plasmide pEt28b

Le clonage de la PLD dans ce plasmide permet l'expression dans la bactérie *E. coli*. De fait, nombre d'études sur les PLD végétales rapportent l'expression inductible fructueuse de l'enzyme en bactérie (Lerchner et al., 2006; Wang et al., 1994).

Le gène inséré dans le plasmide pGAPZB est amplifié par PCR avec des amorces contenant les sites de restriction *AseI* en 5' (amorce 403) et *NotI* en 3' (amorce 055). Le plasmide pET28b est digéré avec les enzymes *NdeI* et *NotI* permettant d'insérer le fragment de PCR *AseI/NotI* puisque, de fait, les extrémités générées par les enzymes de restrictions *NdeI* et *AseI* sont compatibles. Ainsi, la construction de *CsPLD* dans le plasmide pEt28b comporte une étiquette (His)₆ en N-terminal.

Une construction sans étiquette est effectuée dans le même plasmide. Le gène cloné dans le plasmide pGAPZB servant de matrice, celui-ci est amplifié par PCR avec des amorces contenant les sites de restriction *XbaI* en 5' (amorce 404) et *NotI* en 3' (amorce 055). Le plasmide pET28b est digéré avec les enzymes *XbaI* et *NotI* permettant d'insérer le fragment de PCR *XbaI/NotI*.

3.3.1.2.4. Expression de CsPLD

L'activité PLD est généralement détectable dans un extrait brut de lysat cellulaire de la levure *P. pastoris*. Il se trouve ici qu'il n'y a pas de différence entre un extrait exprimant la PLD d'algue et un extrait protéique de cellules transformées par le vecteur vide. Nous avons utilisé différents tests enzymatiques comme le test de fluorescence avec la 8-HQ ou le test chromogénique avec la choline oxydase/peroxydase. Nous avons aussi cherché à détecter l'activité de transphosphatidylation par CCM, et enfin, nous avons tenté de mesurer l'activité PLD en utilisant de la PC radiomarquée. Aucune de ces techniques ne nous a permis de détecter une différence de signal entre les cellules transformées par le vecteur vide et les cellules transformées par le pGAPZB-*CsPLD*.

Dans ce système d'expression, la protéine dans l'extrait brut n'est pas visible sur un gel SDS-PAGE. Nous avons donc tenté de purifier la PLD d'algue par chromatographie sur Octyl Sépharose[®], technique la plus efficace pour purifier les PLD végétales (cf. 3.1.2.2.1. Purification de la *VuPLD*), le but étant d'enrichir la fraction protéique en PLD pour mieux détecter l'activité enzymatique. De fait, comme les PLD végétales purifiées avec succès sur ce

substrat, la CsPLD possède un domaine C2 dans son intégralité. Or, ce domaine est supposé interagir avec le substrat hydrophobe de la colonne quand la protéine est en présence d'ions calcium permettant ainsi sa rétention spécifique. Cependant, nous n'avons pas pu fixer de protéines sur la colonne et aucune activité PLD n'a été détectée dans l'élution. Ceci semble indiquer que l'enzyme a des difficultés à être exprimée dans la levure *P. pastoris*.

Dans le système d'expression inductible bactérien *E. coli*, l'induction permet généralement de voir une bande supplémentaire lors de la séparation du contenu des cellules lysées sur gel SDS-PAGE. Ce n'est pas le cas lors de l'expression de la PLD d'algue et nous ne détectons pas d'activité PLD sensiblement différente par rapport à un lysat de bactéries transformées par le vecteur pEt28b vide. Comme précédemment, différents tests enzymatiques ont été utilisés.

Enfin, aucune activité PLD n'a été détectée dans un lysat cellulaire brut de cellules de *C. subellipsoidea*. Plusieurs tests ont été essayés, notamment le test chromogénique, le test fluorescent avec la sonde 8-HQ, ou encore par radioactivité (cf. 2.2.4. Mesure de l'activité enzymatique). Nous avons aussi testé une autre algue de la famille des diatomées, *Phaeodactylum tricornutum*, gracieusement mise à notre disposition par Éric Maréchal (équipe Biogenèse, dynamique et homéostasie des lipides membranaires de l'Institut de Biosciences et de Biotechnologies de Grenoble) ; et dans cette algue non plus, aucune activité PLD n'a été détectée.

3.3.1.3. Discussion

La capacité des algues à accumuler des TG est un outil de plus en plus étudié afin de produire du biodiesel en grande quantité. A cette fin, la sélection de souches robustes et aptes à la production et l'accumulation en grande quantité de TG, mais aussi l'étude des enzymes participants à la synthèse des TG, leur clonage et leur caractérisation biochimique, peuvent permettre d'augmenter les performances globales des algues et la production durable de TG (Hu et al., 2008).

La PLD fait partie des enzymes de la voie de biosynthèse des TG dont le PA (produit de la réaction catalysée par la PLD) est un des principaux intermédiaires. Cependant, aucune caractérisation de PLD d'algue n'a été rapportée jusqu'à présent.

Malgré le peu de données de la littérature, notre expérience et celle de nos collègues dans leur tentative de mesurer l'activité de la mitoPLD de *C. reinhardtii* sur la PC (Yang and Li, 2016) semblent pointer la difficulté de mesurer une activité PLD chez les algues *in vitro*.

Deux raisons peuvent expliquer cela :

- la première est la façon dont nous cherchons à mesurer l'activité catalytique. Volontairement, nous souhaitons rester dans les conditions usuelles pour les PLD végétales en termes de température (30°C), de quantité d'ions calcium (20 mM), de substrat (DMPC ou POPC dans des micelles mixtes de SDS/Triton X-100) (cf. 2.2.4.1. Test chromogénique). Nous n'avons pas fait varier ces paramètres et il est possible que les PLD d'algues aient une sensibilité toute différente. Nous avons montré que toutes les algues ne synthétisaient pas de la PC, le substrat préférentiel ou exclusif des PLD d'algue (qui sont peut-être plus spécifiques que les PLD végétales vis-à-vis du substrat) peut alors être un tout autre phospholipide comme la PE ou le PG. Cependant, *C. subellipsoidea* est une algue qui synthétise la PC mais on ne sait pas pour autant si c'est le substrat préférentiel de la PLD que nous avons clonée. La similarité de séquence avec celle d'*A. thaliana* existe notamment sur certains motifs, mais l'identité globale est relativement faible (43,6 %). Il est important de noter que lors du test de l'activité *in vitro* de la mitoPLD de *C. reinhardtii*, les auteurs utilisent de la PC comme substrat et ne détecte aucune activité d'hydrolyse ni de transphosphatidylation (Yang and Li, 2016). Cependant, contrairement à *C. subellipsoidea*, *C. reinhardtii* ne possède aucune enzyme de la voie de synthèse de la PC et ne contient, de fait, pas de PC (Sato et al., 2016).
- la seconde raison que nous envisageons, à la vue de nos résultats - que ce soit en système bactérien où l'on n'observe pas de surexpression après induction, ou dans le système levure où nous ne purifions pas d'enzyme - est qu'il y aurait un problème d'expression de la protéine recombinante. Dans *E. coli* un problème de codon peut peut-être se poser même si l'on utilise une souche (BL21) comportant le plasmide pRIPL qui code des codons rares en bactérie. Les codons pourraient ne pas être adaptés à l'expression d'une enzyme de microalgue. La détection par immunoempreinte de la présence de C_sPLD dans un extrait brut de protéines solubles de *P. pastoris* avec un anticorps anti-C2 d'*A. thaliana* indique que la protéine n'est pas exprimée. Un autre moyen de vérifier l'expression aurait été d'amplifier les ARNm de la levure par PCR quantitative et ainsi vérifier si le gène transformé est bel et bien exprimé dans les cellules.

3.3.1.4. Conclusions & Perspectives

Ici, nous clonons la PLD de *C. subellipsoidea*, nous avons montré qu'il s'agissait de la PLD d'algue la plus proche des PLD végétales du point de vue de la séquence primaire. Pour autant, nous ne détectons aucune activité PLD avec nos tentatives d'expression dans la levure *P. pastoris* et la bactérie *E. coli*. L'absence d'expression apparente de l'enzyme dans les systèmes d'expression recombinant que nous avons utilisés (*E. coli* et *P. pastoris*) ne nous permet pas de porter plus loin la caractérisation biochimique de cette enzyme en l'état d'avancement de ce projet de recherche. Il faudra se concentrer sur une optimisation du système d'expression de l'enzyme recombinante.

3.3.2. Détecter et cribler l'activité PLD *in vivo*

Détecter l'activité PLD peut s'avérer fastidieux. Jusqu'à présent nous mesurons l'activité *in vitro*, ce qui suppose l'extraction de protéines et donc la lyse des cellules. Cette méthode efficace et fiable pour mesurer une activité PLD recombinante demeure artificielle à partir du moment où le substrat et sa présentation à l'enzyme ne constitue pas une membrane cellulaire à proprement parler mais des micelles de phospholipides purifiés et de détergents. En particulier dans le cadre des lipases et phospholipases dont le substrat est insoluble, la méthode de présentation du substrat est une condition clef.

Une autre méthode consiste à activer l'enzyme *in vivo* ou ajouter un substrat spécifique (comme le butanol pour la PLD) et extraire ensuite les phospholipides pour quantifier le phosphatidylbutanol issu de l'activité de transphosphatidylolation par CCM avec ou non usage de la radioactivité ou HPLC. C'est notamment ce qui est utilisé pour mesurer l'activité PLD humaine. Ici, encore les conditions ne sont pas les plus proches des conditions physiologiques car le substrat utilisé n'existe pas *in vivo* et est rajouté par l'expérimentateur.

Ainsi, mesurer l'activité *in vivo*, peut s'avérer relativement compliqué en enzymologie. Cela suppose que l'on puisse définir un phénotype particulier avec l'expression d'une enzyme recombinante. Et donc cela suppose d'avoir un contrôle interne qui peut être une souche délétée d'un gène dont on cherche l'activité ou du moins l'impact sur le métabolisme, ou bien une souche transformée par le vecteur vide correspondant au vecteur d'expression de l'enzyme recombinante.

Dans le cas de la PLD, si l'activité PLD en tant que telle est présente dans tous les organismes vivants, l'enzyme responsable de cette activité est variable. Ainsi, la délétion du gène codant la PLD n'a que très peu d'impact sur le phénotype de l'organisme, dans tous les cas les organismes sont viables. C'est ce que l'on observe chez les végétaux (Fan et al., 1997) comme chez les mammifères (Burkhardt et al., 2014). Ceci est aussi dû au fait que plusieurs isoformes existent pour la PLD et comme il a été observé pour la PLD humaine si les deux isoformes PLD1 et PLD2 ont des rôles différents, l'absence de l'une peut être palliée par l'activité de la seconde.

Au cours de ces travaux, nous exprimons différentes PLD végétales dans les levures *P. pastoris* et *S. cerevisiae*. L'expression de ces enzymes ne peut être anodine pour ces organismes. L'action de modification des phospholipides membranaires et l'importance d'une telle enzyme et du produit qu'elle génère dans la cellule (le PA) laissent penser qu'un phénotype particulier peut être développé par les organismes recombinants. De plus, l'implication des PLD dans les pathologies décrites en introduction chez l'Homme indique qu'elles sont centrales dans le métabolisme. Ainsi, il serait possible de déterminer l'activité PLD d'une enzyme clonée par la simple observation d'un phénotype. C'est le but de cette partie de nos travaux de recherches. Il s'agit de déterminer le phénotype d'organismes recombinants qui expriment une PLD en plus de leur PLD endogène, et de pouvoir déterminer par un criblage simple la présence, l'absence et le niveau d'activité PLD.

3.3.2.1. Activité des PLD recombinantes, caractérisation de l'impact sur le lipidome de levure

Tout d'abord nous cherchons à mesurer l'impact de la PLD recombinante sur le métabolisme phospholipidique de la levure. Nous voulons détecter les produits de l'activité PLD et observer si un phénotype particulier se détache.

Le dosage des phospholipides par LC-MS/MS dans les extraits selon la méthode décrite en matériel et méthodes (cf. 2.2.2. Lipidomique) nous permet d'identifier et de quantifier les phospholipides totaux dans les cellules de *P. pastoris*. Nous avons cherché à détecter trois types de phospholipides :

- la PC qui est le phospholipide majoritaire ;
- le PE lui aussi très présent ;
- le PG et le PA qui sont des phospholipides minoritaires.

Le PA est, pour partie, le produit de l'activité PLD (une portion du PA provient du métabolisme : le PA peut être synthétisé à partir du glycérol par phosphorylation et 2 acylations par des acyltransférases) ou à partir de la dihydroxyacétone phosphate qui provient de la glycolyse (acylation + réduction de la fonction cétone + acylation) (Figure 86) et les PC, PE, PI et PG sont de potentiels substrats de l'enzyme recombinante. Nous avons extrait les phospholipides de trois souches différentes de *P. pastoris* :

- la souche contrôle transformée par le vecteur pGAZB vide nous permettra d'évaluer la répartition des phospholipides dans cette souche cultivée dans les mêmes conditions que les souches exprimant une PLD recombinante ;
- la souche transformée par la PLD de *C. subellipsoidea* dont nous avons décrit le clonage en début de ce chapitre et dont aucune technique de mesure de l'activité PLD ne nous a permis de détecter d'activité. Nous verrons ici si l'on observe un phénotype particulier dans le métabolisme lipidique en exprimant cette protéine ;
- la souche transformée par la PLD d'*A. thaliana*, objet majeur de ces travaux de recherche, dont on détecte facilement l'activité *in vitro* dans un extrait brut de protéines solubles. Nous verrons grâce à cette souche si l'enzyme est active *in vivo* et ainsi l'impact de l'expression d'une phospholipase hétérologue sur le métabolisme lipidique de levure ;
- la souche transformée par la PLD de *V. unguiculata*. Cette souche est utilisée pour l'étude structurale décrite au cours du Chapitre 1 car elle exprime une grande quantité d'enzymes. Par ailleurs, l'activité enzymatique mesurée sur un extrait brut de protéines solubles est dix mille fois plus importante que dans la souche exprimant la PLD d'*A. thaliana*. Ici aussi, il sera intéressant d'observer si cette enzyme active *in vitro* est aussi active *in vivo*, et l'impact d'un tel niveau d'activité PLD hétérologue sur la répartition phospholipidique .

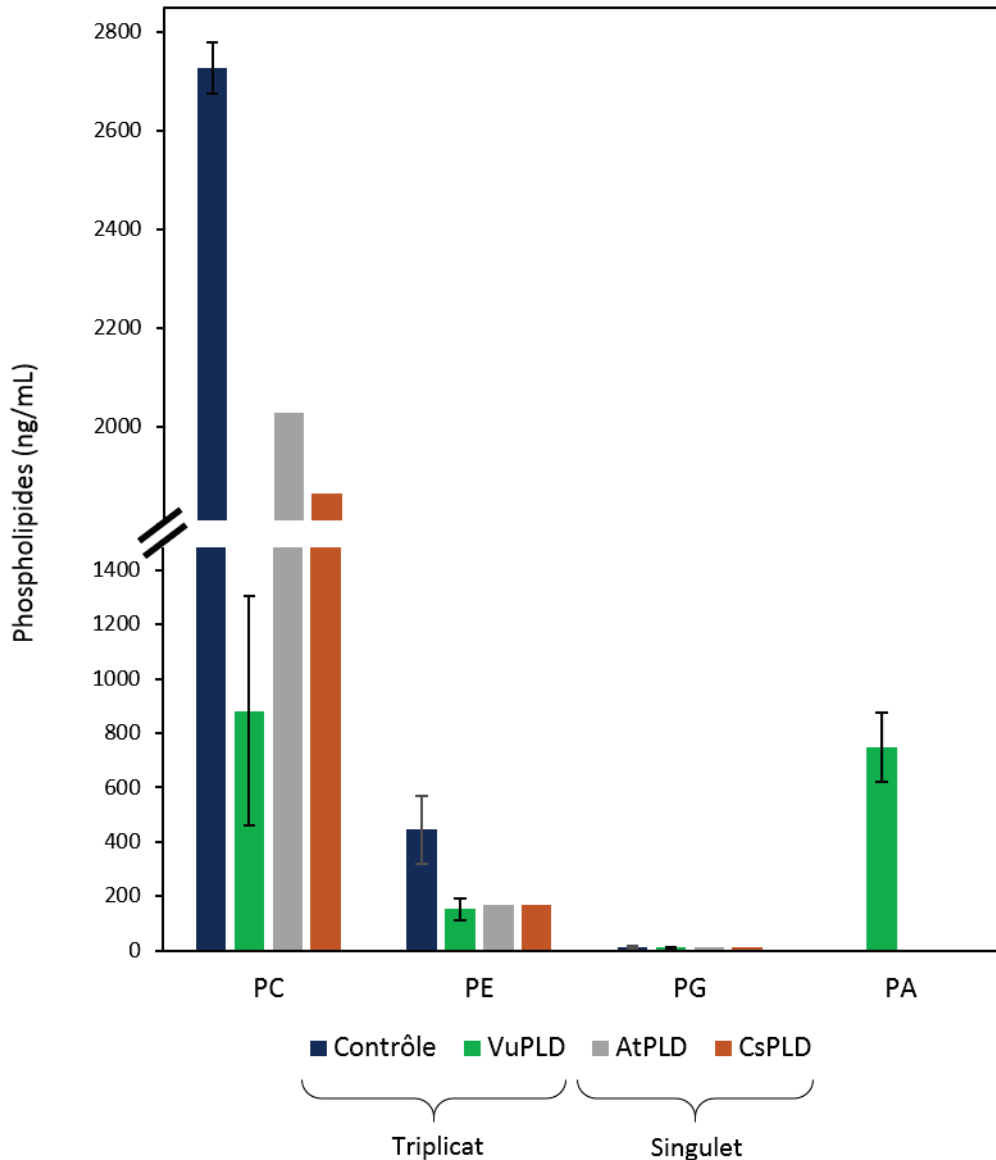


Figure 85 : Dosage des phospholipides dans les souches de *P. pastoris* exprimant une PLD recombinante.

Contrôle : souche de *P. pastoris* transformée par le vecteur vide ; VuPLD : souche de *P. pastoris* exprimant la PLD de *V. unguiculata* ; AtPLD : souche de *P. pastoris* exprimant la PLD de *A. thaliana* ; CsPLD : souche de *P. pastoris* exprimant la PLD de *C. subellipsoidea*.

Les analyses sont effectuées en triplicat pour le contrôle et *VuPLD* et en sigulet pour l'*AtPLD* et *CsPLD*.

La méthode de LC-MS/MS utilisée permet de détecter les phospholipides. Ainsi, la limite de détection déterminée à partir des standards externes injectés auparavant est de 0,2 ng pour la PC, 0,2 ng pour le PG, 0,1 ng pour le PE et 50 ng pour le PA. Pour ce dernier, la technique utilisée (LC-MS/MS) pour cette famille de phospholipides n'est pas spécifique au PA et engendre beaucoup de bruit de fond ce qui explique la différence de limite de détection.

Dans la souche contrôle, on note une grande quantité de PC (2700 ng/mL) qui constitue de très loin le phospholipide majoritaire, suivi par la PE à 450 ng/mL. Le PG est présent en très faible quantité (80 ng/mL) et le PA n'est pas quantifiable dans l'échantillon. Ces résultats sont en parfait accord avec les données de la littérature à ce propos. On retrouve cet ordre de répartition PC > PE > PG (De Ghellinck et al., 2014).

Dans les souches exprimant les PLD recombinantes d'*A. thaliana* et de *C. subellipsoidea*, on n'observe pas de différences majeures par rapport au contrôle, si ce n'est la quantité globale de phospholipides qui est plus faible. On note cependant que la proportion relative de PE par rapport à la PC (8 %) est plus faible que dans le contrôle (16 %). Cependant, les données de ces deux souches ne sont pas en triplicat et une seule extraction a été testée. Le PG comme le PA ne sont pas quantifiables dans ces échantillons. Ainsi, dans ces deux souches exprimant une PLD recombinante on n'observe pas de modification particulière de la composition phospholipidique de la levure.

Dans la souche exprimant la *Vu*PLD, on observe une forte diminution de PC (800 ng/mL) et de PE (150 ng/mL) par rapport à la souche contrôle. Par ailleurs, les données du triplicat indiquent que la quantité de PC est variable. Notons que la proportion PE/PC est équivalente à celle du contrôle (17 %). Dans cette souche, le PA est très présent (750 ng/mL) alors qu'il est indétectable dans les autres souches. Celui-ci, produit de l'activité PLD, indique que la *Vu*PLD recombinante est active *in vivo*. Ces résultats indiquent aussi que la PLD agit sur la PC préférentiellement mais aussi sur la PE.

Ainsi, sur trois PLD recombinantes, une seule semble avoir des conséquences *in vivo*. Compte tenu de la proximité structurale des PLD d'*A. thaliana* et de *V. unguiculata*, et du fait que l'on sait qu'elles sont exprimées par la levure et actives *in vitro*, on s'attend à ce qu'elles aient la même conséquence sur le métabolisme *in vivo*. En réalité il semble que le niveau d'activité du clone « jackpot » exprimant la *Vu*PLD nous permette d'observer son impact sur le métabolisme lipidique, ce que ne nous permet pas d'observer le niveau d'activité de la souche exprimant l'*At*PLD.

Toujours dans l'optique de déterminer l'impact de la PLD recombinante sur le lipidome de la levure, nous cherchons actuellement à déterminer l'usage d'une telle quantité de PA par la levure. Le PA est un phospholipide précurseur d'autres phospholipides mais aussi des TGs. Plusieurs voies de synthèse existent pour fournir le PA précurseur de TG. Bien évidemment à partir des phospholipides *via* l'action de la PLD, mais aussi à partir du glycérol-3-phosphate

(G3P) ou de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), tous deux issus de la glycolyse. Le PA est déphosphorylé par la PA phosphatase (PAP) pour former du DG sur lequel un groupement acyl pourra être transféré par une DG acylCoAacyltransférase (DGAT) pour former un TG. Cependant, le DG peut directement être obtenu à partir des phospholipides *via* l'action de la PLC (Figure 86). Ainsi, une portion des TG est issue du PA et une autre en est indépendante (Sorger and Daum, 2003).

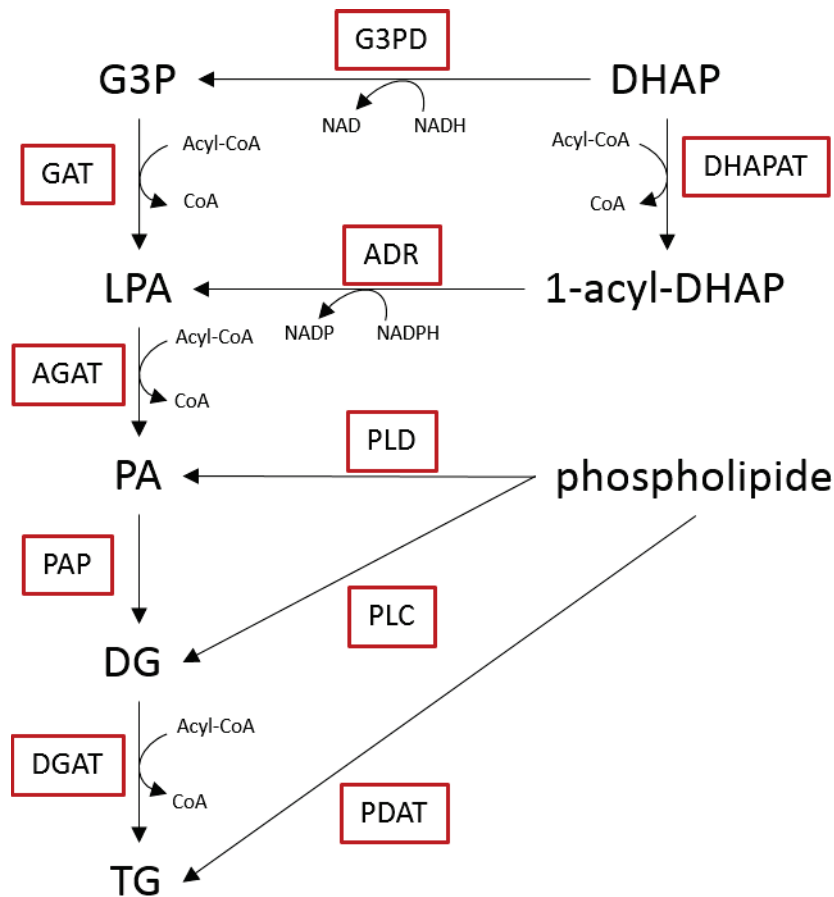


Figure 86 : Voies de synthèse des TGs chez les levures.

G3PD : glycérol-3-phosphate déshydrogénase. GAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase. DHAPAT : dihydroxyacétone-phosphate acyltransférase. ADR : 1-acyl-dihydroxyacétone-phosphate réductase. AGAT : 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase. PAP : PA phosphatase. DGAT : diacylglycérol acyltransférase. PDAT : phospholipide diacylglycérol acyltransférase.

Nous avons donc extrait les TG totaux de la souche contrôle et de la souche exprimant la *Vu*PLD afin de les analyser et déterminer :

- si la quantité de TG est plus importante en présence de PLD recombinante indiquant que le PA est, pour partie, métabolisé dans la synthèse de TG ;
- quelle proportion de PA sert à la synthèse de TG en comparaison avec la souche contrôle (transformée par le vecteur vide), où l'on évaluera l'action de PLD et PLC endogène.

Nous sommes capables de quantifier le PA dans la souche exprimant la *Vu*PLD, ceci indique que tout le PA n'est pas métabolisé et qu'une proportion demeure intacte. Ceci peut aussi s'expliquer par la quantité de PA présente qui est trop importante pour être métabolisée directement après sa synthèse par la PLD.

S'il s'avère, de fait, que la proportion de TG est plus importante dans une souche exprimant une PLD recombinante, nous testerons alors la quantité de TG dans les souches exprimant l'*At*PLD et la *Cs*PLD où l'on ne détecte pas le PA par LC-MS/MS. En effet, la quantité moindre de PA synthétisée par ces enzymes peut directement être métabolisée dans les TG, et donc le PA peut s'avérer non quantifiable. Dans cette hypothèse, seule la quantification des TG pourra nous indiquer l'activité *in vivo* de ces PLD recombinantes.

3.3.2.2. Mise au point d'un test de criblage simple de l'activité PLD *in vivo*

Comme nous le disions précédemment, il y a un grand avantage méthodologique à pouvoir cribler une activité enzymatique *in vivo*, à savoir dans un milieu non contrôlé par l'expérimentateur.

Nous cherchons ici à mettre au point un système de criblage de l'activité PLD recombinante *in vivo*. Le but est de pouvoir discriminer la présence d'une activité PLD de son absence, mais aussi de discriminer différents niveaux d'activité enzymatique. Dans le cadre de nos recherches sur les résidus importants de l'enzyme, impliqués dans la catalyse, la structure ou encore l'interaction avec le substrat (cf. Chapitre 1), mais aussi dans le cadre de notre étude sur la régulation de l'enzyme et du domaine minimum (cf. Chapitre 2), nous montrons l'impact des modifications que nous apportons (troncature, mutation) sur l'activité catalytique *in vitro*. Il serait intéressant de connaître l'impact de la protéine mutée dont nous montrons qu'elle est exprimée même inactive, sur le métabolisme de la levure.

Pour mettre au point ce criblage sur boîte de Petri nous utilisons la souche de *P. pastoris* exprimant la *Vu*PLD, cette souche utilisée dans ce travail pour l'étude structurale exprime fortement l'enzyme recombinante. Comme contrôle, nous utilisons la souche de *P. pastoris* transformée par le vecteur vide. Il s'agit donc ici de chercher à déterminer un phénotype dû à l'activité PLD et/ou à la présence de PA en grande quantité dans des conditions particulières de cultures afin de distinguer ces deux souches.

Les expériences effectuées par Mialitiana Solo Nomenjanahary, au cours de son stage de Master 1, font varier les conditions de culture sur boîte dans un milieu YPG supplémenté en éléments favorisant le stress cellulaire. C'est le cas du NaCl (0,5 mM) ou du dithiothreitol (DTT à 3,2 mM), un inducteur du stress du réticulum endoplasmique dont l'effet favorise l'influx de Ca^{2+} intracellulaire. C'est aussi le cas du chlorpromazine (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) qui, en inhibant la calcineurine, favorise aussi l'influx de Ca^{2+} (Deng et al., 2006; Zhao et al., 2013), et enfin du SDS (0,001 et 0,01 %), dont le rôle est de favoriser l'entrée du calcium dans les cellules. Le but ici est de favoriser l'activation de la PLD exprimée dans le milieu intracellulaire en favorisant l'entrée du calcium. Des conditions en présence de 10 % d'éthanol, pour augmenter le stress cellulaire, sont aussi testées. Ces conditions de stress cellulaires sont donc testées avec et sans ions calcium (de 0, 0,1, 0,5 et 1 M), cofacteur des PLD végétales.

Aucune de ces conditions n'a permis d'établir un phénotype particulier de la levure lorsque celle-ci exprime une PLD recombinante avec une forte activité enzymatique (*V. unguiculata*) ou lorsque celle-ci est transformée par le plasmide vide.

Cette méthodologie de criblage ne nous permet donc pas de distinguer ces deux souches dont le lipidome pourtant diffère. Pour mettre au point un tel criblage nous allons utiliser la levure *S. cerevisiae*, dont il a été montré il y a quelques années qu'une souche délétée de la PLD endogène SPO14 était sensible à la présence d'un lipide particulier dans le milieu de culture (Kennedy et al., 2011).

3.3.2.3. La PLD SPO14 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Comme nous le décrivions précédemment, la levure *S. cerevisiae* est un organisme intéressant car toute une base de données de mutants ponctuels de chacun de ses gènes existe. De façon tout à fait étonnante, nous n'avons pas détecté d'activité PLD lorsque nous avons tenté d'exprimer la PLD d'*A. thaliana*, une enzyme habituellement active *in vitro* quand elle est produite dans une levure comme *P. pastoris*. Ici, nous étudions la PLD endogène de *S. cerevisiae*, SPO14.

3.3.2.3.1. Le rôle de SPO14

Découvert en 1995 par deux équipes simultanément, le gène *spo14*, déjà décrit comme impliqué dans la méiose, est cloné dans le système baculovirus/cellules d'insectes. Les auteurs déterminent alors qu'il code une PLD aux propriétés similaires de celle de l'Homme (Rose et

al., 1995). Celle-ci nécessite du PIP₂, hydrolyse la PC et possède 21 % d'identité avec la PLD de ricin. D'autres auteurs identifient le gène et déterminent que l'enzyme n'est pas nécessaire à la croissance de la cellule en construisant une souche délétée *spo14*^{-/-}. Cependant, une telle souche ne sporule pas (Waksman et al., 1996).

Les deux équipes notent la proximité structurale du gène avec celui de la PLD humaine, de fait SPO14 possède les domaines régulateurs PX et PH. En plus de cela, elle possède un domaine supplémentaire phosphorylé impliqué dans la localisation et situé en N-terminal du PX-PH (Figure 8).

La maladie d'Alzheimer se caractérise par la formation de plaques issues de l'agrégation du peptide β -amyloïde. Ce peptide est issu du clivage protéolytique de la protéine APP pour *Amyloid Precursor Protein* par des β - et γ -sécrétases. On sait depuis longtemps qu'il y a une diminution des phospholipides dans les cerveaux atteints et une augmentation parallèle des produits du catabolisme de ceux-ci. Ainsi, il existe un vrai lien entre les phospholipases et la maladie d'Alzheimer (Kanfer et al., 1998). Une étude plus récente a montré que la PLD1 était fortement exprimée dans les astrocytes des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, la PLD1 forme un complexe avec l'APP dont l'interaction se situe au niveau du domaine PH et semble activée par le peptide β -amyloïde (Jin et al., 2007). D'autres auteurs ont mis en avant le rôle indispensable de la PLD2 dans l'effet synaptotoxique du peptide β -amyloïde (Oliveira et al., 2010). Ainsi, le rôle de la PLD dans cette pathologie est clairement démontré.

Partant du constat de la perturbation du métabolisme phospholipidique dans le cadre de cette maladie, l'équipe de Kristin Baetz (Université d'Ottawa) a utilisé le modèle de *S. cerevisiae* pour étudier l'impact de certains phospholipides, notamment les facteurs d'activation plaquettaires PAF pour *Platelet Activating Factor*, dérégulés dans le cadre pathologique. Ainsi, le 1-*O*-hexadecyl-2-acétyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (C16:0 PAF) est fortement présent et impliqué dans la toxicité du peptide β -amyloïde, ce qui n'est pas le cas de son précurseur, le 1-*O*-hexadecyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (C16:0 lyso-PAF) (Kennedy et al., 2011).

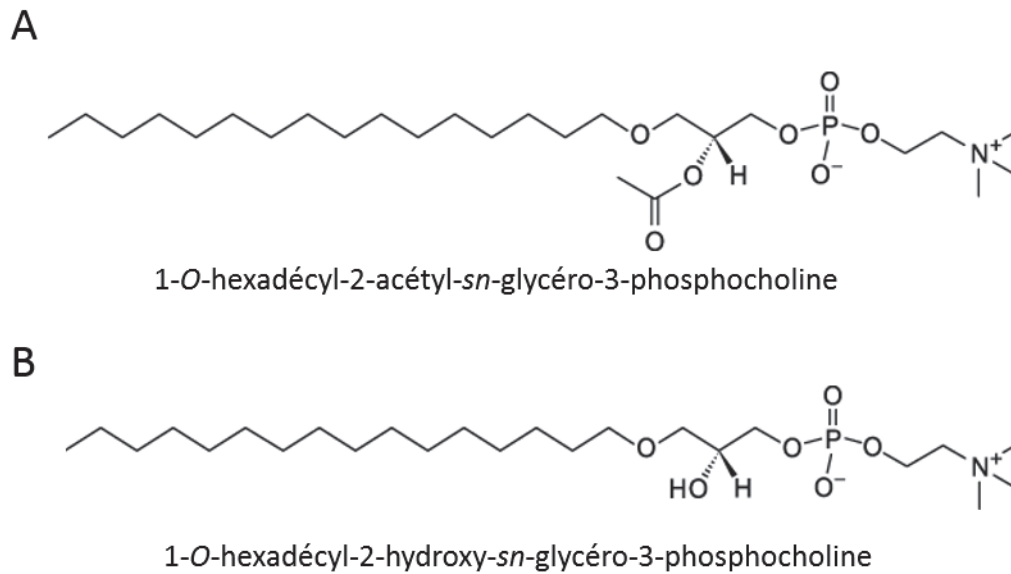


Figure 87 : Représentation schématique du PAF.
A) C16:0 PAF. B) C16:0 lyso-PAF.

3.3.2.3.2. Impact de la délétion du gène *spo14* et de l'expression d'une PLD recombinante en levure

Les auteurs de cette étude (Kennedy et al., 2011) utilisent deux souches de *S. cerevisiae*, une souche de type sauvage YKB 2239 et une souche délétée de la PLD SPO14 YKB 2079 (cf. 2.1.1.2. Souches de levure, milieux et conditions) et dont le gène *spo14* a été remplacé par un gène participant à la biosynthèse du tryptophane.

Nous avons d'abord étudié la croissance de ces deux souches gracieusement mises à notre disposition par Kristin Baetz.

Il apparaît que la cinétique de croissance est différente entre ces deux souches. La souche délétée *spo14*^{-/-} pousse plus vite que la souche sauvage, que ce soit sur milieu riche YPG (Figure 88A) ou milieu appauvri YNB supplémenté avec les acides aminés dont les levures sont auxotrophes (Figure 88B). Il semble ici que l'absence de la PLD SPO14 provoque un phénotype de croissance différent de celui du type sauvage, ainsi la PLD aurait un effet direct sur la croissance des cellules. On peut, de fait, imaginer que son activité d'hydrolyse des phospholipides et de remodelage de la membrane freine la croissance cellulaire.

Nous avons donc testé la souche de *P. pastoris* exprimant la *VuPLD*, dont nous avons montré précédemment que cette protéine avait un réel impact sur le lipidome de la levure en comparaison avec une souche témoin transformée avec le vecteur vide. Ici, en observant les

cinétiques de ces deux souches, nous ne notons pas de différences de croissance (Figure 88C). Ainsi, dans ce cas présent, l'activité PLD *in vivo* n'a aucun impact sur la cinétique de croissance des cellules.

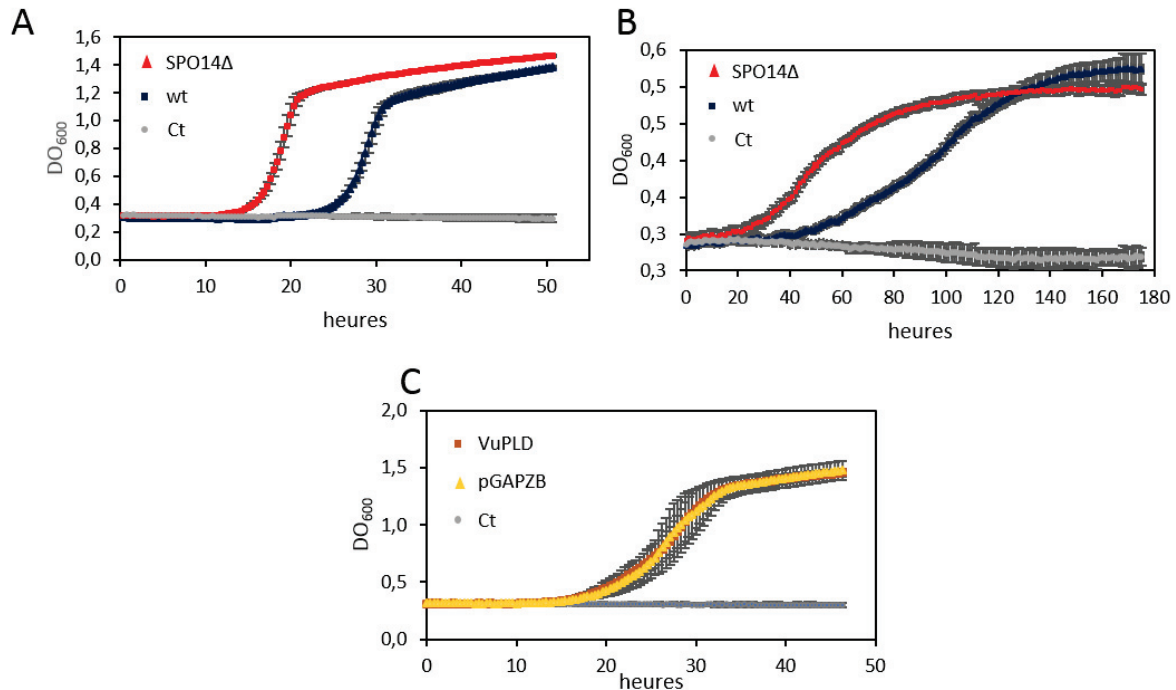


Figure 88 : Cinétique de croissance comparative entre les différentes souches de *S. cerevisiae* avec et sans SPO14 et *P. pastoris* exprimant ou non une PLD recombinante.

Chaque cinétique est réalisée trois fois. A) Cinétique de croissance comparative de la souche YKB 2239 (wt) et YKB 2079 (SPO14Δ) qui est la souche délétée du gène *spo14* (*spo14*^{-/-}) sur un milieu riche (YPG). Le témoin (Ct) est le milieu YPG nonensemencé. B) Cinétique de croissance comparative de la souche YKB 2239 (wt) et YKB 2079 (SPO14Δ) qui est la souche délétée du gène *spo14* (*spo14*^{-/-}) sur un milieu appauvri (YNB) supplémenté en Histidine, Lysine, Leucine, Adénine, Uracile et Tryptophane. Le témoin (Ct) est le milieu YNB + acides aminés nonensemencé. C) Cinétique de croissance comparative de la souche de *P. pastoris* transformée par le vecteur vide (pGAPZB) et de la souche exprimant la PLD de *V. unguiculata* (*VuPLD*) sur un milieu riche (YPG). Le témoin (Ct) est le milieu YPG nonensemencé.

Deux possibilités existent :

- ce phénotype de la PLD impactant la croissance n'est observable que sur la levure *S. cerevisiae* et non sur *P. pastoris* et serait propre à celle première ;
- Il existe une différence fonctionnelle entre la PLD SPO14 et *VuPLD*, ce qui explique l'impact de l'une sur la croissance et non de l'autre. Notons ici que, dans un cas, l'expression de l'enzyme est hétérologue (*VuPLD*) alors qu'il s'agit de l'activité endogène pour *S. cerevisiae*.

3.3.2.3.3. Criblage de l'activité PLD en présence du lipide C16:0 PAF

Nous avons alors étudié le criblage utilisé par l'équipe de Kristin Baetz. Ceux-ci observent alors une différence de phénotype entre les deux souches. La souche SPO14Δ montre des difficultés de croissance en présence de C16:0 PAF. Le phénotype normal est retrouvé quand la PLD SPO14 est exprimée dans cette souche délétée (*spo14*^{-/-}) transformée par le plasmide pME962 codant le gène *spo14* (Figure 89B) (Kennedy et al., 2011).

Nous reproduisons ces expériences de complémentations dans les mêmes conditions, ce qui nous permet de confirmer leurs résultats (Figure 89).

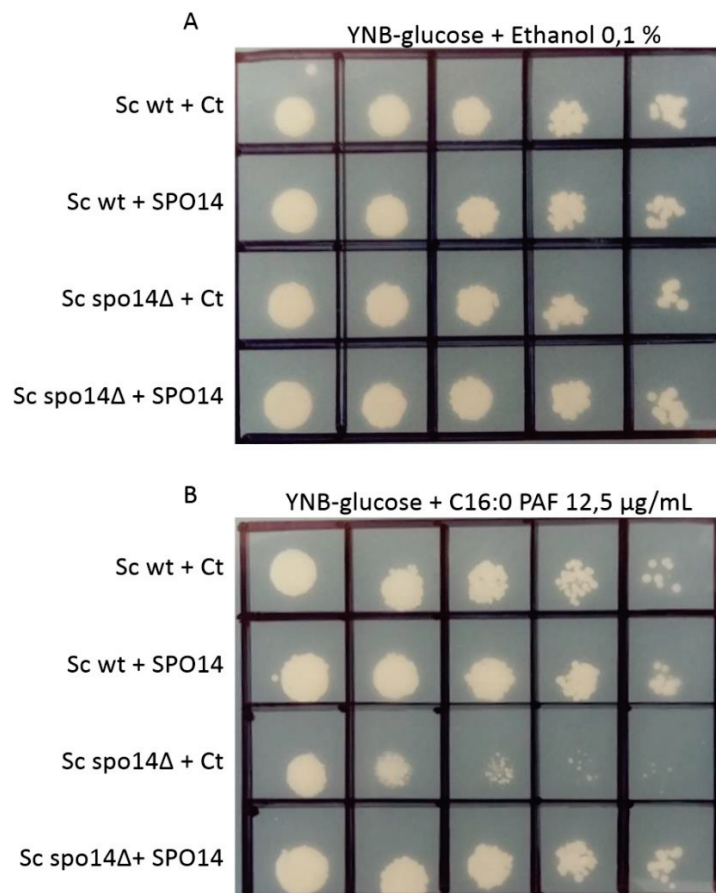


Figure 89 : Etude du phénotype de la souche sauvage et de la souche *spo14*^{-/-} en présence de C16:0 PAF.

A) Cultures contrôle sur un milieu contenant YNB contenant Histidine, Lysine, Leucine, Adénine, Uracile, Tryptophane et de l'éthanol, solvant de dilution du C16:0 PAF en B. B) Cultures sur un milieu supplémenté en C16:0 PAF.

Sc wt : souche sauvage YKB 2239. Sc spo14Δ : souche mutée YKB 2079, délétée du gène *spo14* (*spo14*^{-/-}). Ct : pRS415, plasmide contrôle. SPO14 : pME962, plasmide codant le gène *spo14*. Le détail des plasmides est en Figure 20. Les cellules sont diluées en cascade au 1/10^{ème} (de 10⁻¹ à 10⁻⁶).

Ainsi, ils arrivent à compléter le mutant SPO14Δ en exprimant de façon recombinante l'enzyme endogène SPO14.

3.3.2.3.4. Test de complémentation avec la PLD d'*A. thaliana*

Toujours dans l'optique de pouvoir évaluer l'activité PLD *in vivo* directement et facilement sur boîte, nous cherchons à compléter le phénotype de croissance sur C16:0 PAF de la souche YKB 2079 (*spo14^{-/-}*) en transformant celle-ci avec un plasmide codant la PLD d'*A. thaliana*. Cette expérience de complémentation est le meilleur exemple pour montrer l'activité *in vivo* aussi bien que l'impact de l'activité PLD en tant que telle sur la croissance cellulaire dans de telles conditions.

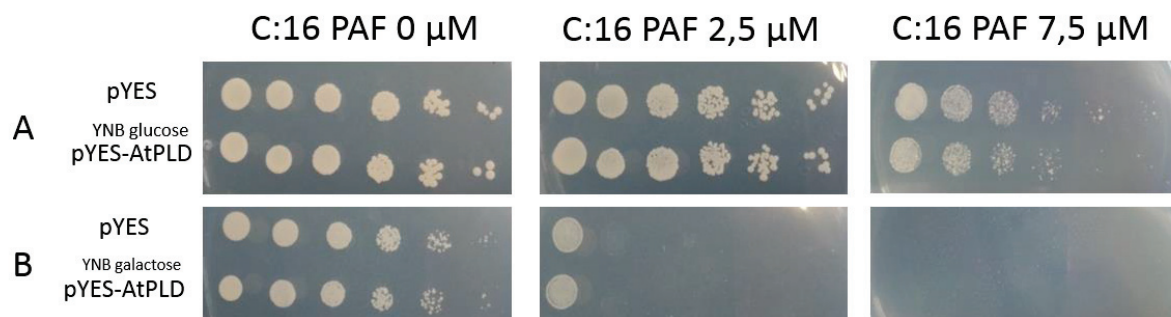


Figure 90 : Test de Complémentation de la souche YKB 2079 $\Delta spo14$ par la PLD d'*A. thaliana*.

A) La souche est transformée par le plasmide pYES (contrôle) et le plasmide pYES-*AtPLD* et cultivé sur milieu YNB-Glucose supplémenté en Histidine, Lysine, Leucine, Adénine et Tryptophane et pour différentes concentration en C16:0 PAF. B) La souche est transformée par le plasmide pYES (contrôle) et le plasmide pYES-*AtPLD* et cultivé sur milieu YNB-Galactose supplémenté en Histidine, Lysine, Leucine, Adénine et Tryptophane et pour différentes concentration en C16:0 PAF. Les cellules sont diluées en cascade au 1/10^{ème} (de 10⁻¹ à 10⁻⁶).

La souche YKB 2079 (*spo14^{-/-}*) est transformée par le vecteur pYES et le vecteur pYES-*AtPLD*. Le plasmide pYES est un plasmide inductible au galactose (cf. 2.1.3.2.3. pYES2). Ainsi, on n'observe pas d'effet de la complémentation de la PLD sur milieu YNB-glucose car l'expression de la PLD n'est pas induite. On note que le C16:0 PAF est toxique pour les cellules à partir de 7,5 μM (Figure 90A).

Avec induction de l'expression sur milieu contenant du galactose, on ne note pas non plus d'effet de l'expression de la PLD d'*A. thaliana* (Figure 90B). Celle-ci ne complémente donc pas le phénotype et ne permet pas la survie en présence de C16:0 PAF. On note dans ce cas présent que les cellules avec ou sans PLD recombinante sont plus sensibles au C16:0 PAF en présence de galactose qu'en présence de glucose.

Ici, la PLD d'*A. thaliana* ne complète pas l'activité manquante de SPO14, ceci peut s'expliquer de deux façons :

- tout d'abord, l'activité de la PLD d'*A. thaliana* clonée dans le pYES et exprimée dans *S. cerevisiae* n'a jamais été détectée (voire 2.2). Nous n'avons pas détecté l'expression de l'enzyme par immunoempreinte.
- l'activité de la PLD d'*A. thaliana* n'est pas suffisante pour détoxifier l'action du C16:0 PAF. Ceci signifie que SPO14 aurait une activité complémentaire différente ou bien une activité PLD beaucoup plus importante. Ceci peut, dans tous les cas, constituer une preuve de l'activité complémentaire d'une PLD comme SPO14 par rapport aux autres PLD du vivant.

3.3.2.4. Conclusion & perspectives

Ainsi, si l'on observe un phénotype particulier en présence de C16:0 PAF entre une souche de type sauvage et une souche délétée du gène codant la PLD, cette différence n'est pas compensée par l'expression d'une PLD hétérologue.

Considérant le problème d'expression dans la levure *S. cerevisiae* de l'*AtPLD* clonée dans le pYES, nous pourrions tenter de cloner ce gène dans le plasmide d'expression utilisé par l'équipe de Kristin Baetz, à savoir le plasmide pRS415.

Actuellement, une autre stratégie est en cours de réalisation. Il s'agit de transposer les constatations de Kennedy *et al.*, sur la levure *P. pastoris*. Des expériences sont en cours pour déléter la souche X33 de *P. pastoris* de sa PLD endogène. Le but est de remplacer le gène *spo14* dans cette souche par un gène codant une protéine qui confère la résistance à la kanamycine. Le clonage est en cours pour intégrer le gène *KanMX* entre le promoteur et le terminateur du gène *spo14* et, par la suite, transformer une telle construction qui s'intégrerait dans le génome en lieu et place du gène *spo14*. Ceci nous permettra d'évaluer d'une part la différence de phénotype de croissance et d'autre part la croissance en présence de C16:0 PAF. En parallèle, le gène *spo14* de *P. pastoris* est cloné pour :

- compléter *P. pastoris spo14^{-/-}* avec sa PLD endogène exprimée de façon recombinante
- être exprimé dans *S. cerevisiae* YKB 2079 délétée *spo14^{-/-}*, et ainsi observer si on peut remplacer la PLD SPO14 de *S. cerevisiae* par un hétérologue proche issu d'une autre

levure et compléter le phénotype en présence du C16:0 PAF. Ceci nous permettra de vérifier l'action d'une PLD du même type que SPO14.

Mettre au point un tel système de criblage simple et rapide sur boîte nous permettra, à terme, d'évaluer l'activité PLD *in vivo* visuellement et efficacement. En réalisant des dilutions de cellules successives (comme en Figure 89 et en Figure 90), ce système de criblage sera aussi un outil efficace pour quantifier l'activité PLD selon la dilution à laquelle les cellules sont encore capables de pousser.

4. Conclusion générale & perspectives

Ces travaux de thèse proposent une caractérisation des PLDs, à la fois sur le plan fonctionnel mais aussi sur le plan structural.

Nos recherches ont été effectuées sur le plan fonctionnel avec pour modèle l'*At*PLD recombinante exprimée dans la levure *P. pastoris*. Grâce à cette protéine, clonée à partir de l'organisme modèle en biologie végétale il y a quelques années (Dyer et al., 1995), nous avons cherché à comprendre son mécanisme en mutant de façon ponctuelle les résidus les plus conservés. C'est sur un échantillon de 209 séquences de PLD végétales obtenues en criblant plus de 30 bases de données différentes que nous avons pu déterminer une séquence consensus et ainsi sélectionner les résidus les plus conservés au cours de l'évolution. Ces résidus sont donc les résidus des motifs HKD, mais aussi des résidus non décrits dans la littérature et conservés dans des domaines communs à toutes les PLD, dont les PLD humaines. Ainsi, cette étude nous permet de transposer nos résultats à la PLD humaine, véritable cible thérapeutique. La mesure de l'activité catalytique de l'enzyme mutée nous permet de postuler sur le rôle des résidus mutés. Ainsi, à l'issue de ces travaux avec 41 résidus mutés de façon ponctuelle, nous redéfinissons ce que la littérature décrit comme les deux motifs HKD (N- et C-terminal) et étendons leur longueur et donc leur complexité. Alors qu'ils sont chacun décrits comme "HXKX₄K", nos travaux nous permettent de définir le motif N-terminal ainsi : "HHXKX₄D", et le motif C-terminal plus étendu encore "YXHXX₂IXDDX₆GS-ANXNX₂RSM". L'analyse de l'expression des protéines indique que les mutants sont correctement exprimés malgré l'aspect inactif de la PLD. Cependant, l'expression protéique de certains mutants, notamment P771A, G778A et G798A ou encore l'aspartate D669A directement en aval de l'aspartate catalytique ou D689A (dont on pense qu'il stabilise l'histidine catalytique), est sujette à débat laissant penser qu'ils ont aussi un rôle dans la stabilité structurale de l'enzyme. Nous pouvons ainsi définir des domaines essentiels à l'activité enzymatique comme le domaine "PREPWDIH" ou encore le domaine "PPILTT" spécifique aux PLD α végétales, mais aussi relativiser l'importance de certains résidus conservés comme S348 ou Q522, dont on observe que les mutants conservent tout ou partie de leur activité catalytique.

A terme, la caractérisation biochimique et structurale de ces mutants est essentielle de façon à cibler leur rôle au sein des PLD. Ces expériences supposent que les mutants soient purifiés ; ce que ne permet pas notre méthode d'expression actuelle dans la levure *P. pastoris*. Ainsi, le transfert de ces constructions dans un système d'expression plus adapté à la purification de protéines permettra d'étudier ces enzymes modifiées, notamment par dichroïsme circulaire pour

déterminer les modifications structurales potentielles entraînées par les mutations ponctuelles. De même, il sera intéressant d'observer leur capacité d'interaction avec le substrat dans un système de film monomoléculaire, par exemple de façon à déterminer si les résidus mutés sont impliqués ou non dans la fixation ou l'adsorption de l'enzyme à son substrat.

Un deuxième axe de recherche a concerné l'étude de la structure des PLD végétales à travers celle de *Vigna unguiculata*, dont le but est de déterminer la structure 3D. Nous avons purifié la *VuPLD α* à homogénéité et, à l'issue de cinq criblages de cristallogénèse successifs, nous avons pu obtenir des cristaux. Cependant, jusqu'à présent, et ce malgré la diversité des conditions où les cristaux ont été obtenus, tous ces cristaux demeurent identiques dans leurs propriétés. Si ces cristaux diffractent à une résolution idéale, leur principal défaut est que la maille est trop petite pour contenir la PLD entière. Ainsi, deux hypothèses sont envisageables. Ou bien un morceau de l'enzyme cristallise, auquel cas l'enzyme subit un clivage protéolytique au cours de la cristallogénèse. Ou bien un contaminant de purification cristallise à la place de la PLD. Nous n'avons pas pu identifier l'espèce qui cristallisait, et pour cause, les cristaux sont très petits. De fait, les outils de modélisation actuels nous permettraient, à partir d'un jeu de données de diffraction aux rayons X, de modéliser une structure en connaissant la séquence. Lors de l'écriture de ces lignes de nouveaux cristaux de PLD α sont en cours d'analyse.

La perspective de ces travaux est d'obtenir une première structure d'une PLD eucaryote. De fait, les structures procaryotes existantes nous permettent de postuler sur le repliement adopté par les motifs HKD formant une poche catalytique à l'interface des deux lobes, mais à l'heure actuelle :

- nous ne savons pas si ce repliement est le même chez les eucaryotes,
- nous ne connaissons pas la position des domaines régulateurs vis-à-vis du cœur catalytique.

Ce deuxième point est important car seules les PLD eucaryotes possèdent des domaines régulateurs distincts que l'on retrouve dans d'autres enzymes comme le domaine C2 pour la PLD α végétale ou les domaines PX et PH des PLD de mammifères.

Ainsi, dans l'optique de définir la position relative de ces domaines régulateurs par rapport au cœur catalytique des PLD, nous avons effectué une expérience de SAXS. Cette méthode de mesure des rayons X diffusés en solution permet entre autres de suivre les mouvements de protéines. En se basant sur le fait que le domaine C2 de la PLD végétale changeait de

conformation en présence de Ca^{2+} (Zheng et al., 2000), nous avons essayé de suivre cette modification structurale par la méthode de SAXS. Tout d'abord, nous avons défini un modèle à basse résolution de la *Vu*PLD. Ce modèle, en accord avec la littérature, présente une PLD de forme ovoïde plus ou moins symétrique selon les modèles obtenus. En présence de Ca^{2+} nous observons une dénaturation partielle de la protéine ne permettant pas alors de calculer un modèle. Cette dénaturation partielle est proportionnelle à la concentration en Ca^{2+} utilisée, ainsi il semble qu'en présence de Ca^{2+} la protéine expose des surfaces hydrophobes entraînant sa précipitation en l'absence du substrat. Ce phénomène est probablement favorisé par les rayons X. Cependant, la diminution de la quantité de Ca^{2+} au contact de l'enzyme ne permet pas d'observer un changement conformationnel majeur ce qui semble indiquer que ces modifications s'effectuent par des mouvements de résidus ou de structures secondaires mais pas de domaines entiers. Cette expérience, si elle nous permet de connaître la forme globale de la protéine, ne nous permet donc pas de définir la position du domaine C2 dans la structure 3D de la protéine.

L'utilisation de la PLD végétale demeure à ce jour le meilleur outil pour obtenir la structure 3D d'une PLD eucaryote. C'est, de fait, le seul type de PLD eucaryote à motifs HKD purifié à homogénéité. Si le niveau de pureté de la protéine obtenue dans ce travail de thèse est exploitable dans une étude structurale, la quantité de protéines, quant à elle, demeure insuffisante pour cribler au mieux, avec plus de protéines et de façon homogène des conditions de cristallogenèse. Ainsi, deux possibilités émergent :

- la production dans la levure recombinante pourrait s'effectuer dans un fermenteur, ce qui permet une plus grande capacité de culture et donc une masse de cellules plus importante. Avec des colonnes d'Octyl Sépharose® adaptées en taille et volume, la quantité de protéines purifiées pourrait être nettement augmentée.
- l'expression de la protéine *in levuro* peut s'effectuer de façon inductible et non plus constitutive comme c'est le cas dans ce travail.

Ces opérations permettraient d'augmenter considérablement la quantité de protéine produite.

Un des défis qu'impose l'étude de ces enzymes et auquel nous avons été confrontés est l'aspect partiellement hydrophobe des PLD végétales. Ces enzymes solubles ont la capacité de s'adsorber à une membrane pour catalyser leur réaction enzymatique, cet aspect dual hydrophile-hydrophobe est un des paramètres rendant difficile la concentration d'une enzyme pure et sa conservation. En cela s'explique une partie de nos difficultés à obtenir des cristaux.

En se basant sur les données de la littérature, nous proposons un modèle structural potentiel pour toutes les PLD. Notre hypothèse de travail part du constat bilobé de ces enzymes et donc de la symétrie de structure 3D autant que de structure primaire. Ceci nous permet de postuler sur un repliement commun à chaque lobe de l'enzyme que nous analysons avec différents outils. Après modélisation du cœur catalytique et comparaison avec l'alignement des structures secondaires de chaque lobe, nous sommes en capacité de fournir un repliement global applicable à toutes les PLD de type HKD du vivant. Ce repliement contient la structure α/β hydrolase typique des lipases et s'organise autour d'un feuillet β de huit brins entourés de trois hélices α à la face externe et une hélice α à la face interne.

Nous avons poursuivi la caractérisation fonctionnelle de l'enzyme en travaillant non plus sur des résidus ponctuels mais sur des portions de séquences. L'activité catalytique de l'enzyme est ainsi modulée de façon à mieux comprendre le rôle des domaines constituant la séquence primaire et les structures secondaires. Nous avons cherché notamment à caractériser le domaine minimum de l'enzyme en réduisant des portions de protéines en N-terminal. Cette délétion successive du domaine C2 s'effectue par PCR en se basant sur un modèle structural établi précédemment au laboratoire (Rahier et al., 2016a). Nous avons observé que la délétion du moindre fragment de la protéine entraîne une abolition de son activité catalytique, montrant ainsi que l'enzyme totalement délétee du domaine C2, son domaine régulateur, est inactive. Nous notons cependant que des clones exprimant la PLD tronquée de 70 résidus présentent de l'activité catalytique. Ainsi, ces résultats nous permettent de postuler que la partie initiale de l'enzyme directement en aval de la méthionine initiale comme la partie terminale du domaine C2 sont essentielles à l'activité catalytique mais pas à l'expression de la protéine. De fait, nous montrons que les domaines minimums sont exprimés en révélant la présence de la protéine par immunoempreinte avec un anticorps spécifique. A l'inverse, la construction N Δ 70 nous indique que les deux premiers CBR ne sont pas essentiels à l'activité enzymatique.

Nous avons étudié alors cette portion particulière chez les PLD végétales puisque la littérature montre à plusieurs reprises, sans pour autant chercher à le comprendre, que l'enzyme purifiée est clivée des 35 premiers résidus. Nous constatons ce clivage dans notre système d'expression recombinant *in levuro*. Nous avons testé, dans un premier temps, une hypothèse développée dans la littérature du clivage du domaine C2 par une aspartique protéase (Simões et al., 2005). Cependant, l'expression dans un mutant de *P. pastoris* sur une aspartique protéase PEP4 n'empêche pas le clivage de l'enzyme. Nous avons donc effectué des mutations du site de

clivage tel qu'il est décrit dans la littérature et des résultats obtenus au laboratoire (Rahier et al., 2016a). En exprimant une enzyme fusionnée en N-terminal avec une étiquette (His)₆, nous pourrions évaluer la quantité de protéine clivée ou non en purifiant sur une colonne de nickel dont la propriété est de retenir ce type d'étiquette. Cependant, le fait que l'on retienne une quantité significative de protéine étiquetée (His)₆ non mutée sur le site de clivage ne nous permet pas de conclure quant aux mutants qui se fixent tout aussi bien que l'enzyme étiquetée (His)₆, mais qui, à l'inverse, ne présentent aucune activité enzymatique.

Le phénomène du clivage des PLD qui s'apparente à une maturation de l'enzyme n'est toujours pas compris. Nos travaux montrent cependant que même en purifiant l'enzyme sur un substrat hydrophobe, l'isoforme non clivée peut être présente et donne lieu à une protéine active. Ces résultats remettent en question le consensus admis dans la littérature du clivage des PLD végétales. Nos tentatives d'expression de l'enzyme avec une étiquette de purification se heurtent à la faible quantité de protéine produite qui ne nous permet probablement pas de la purifier par cette technique et donc d'observer et d'étudier le clivage de la PLD. Ce que nous montrons en tout cas c'est la présence de la protéine avec son étiquette témoignant ainsi du fait que toute la population de protéine exprimée n'est pas clivée.

Toujours dans une optique de modulation de l'activité, un axe majeur de ces travaux a été de cribler un nouvel inhibiteur des phospholipases D. À la vue de l'implication de ces enzymes dans le métabolisme et l'impact qu'elles ont dans des pathologies de premier ordre comme le cancer, l'inhibition de ces enzymes constitue une voie thérapeutique. Nous avons utilisé une PLD pure eucaryote pour cribler la chimiothèque de l'ICBMS et ceci constitue une première dans la littérature du criblage d'inhibiteur de la PLD. Au cours du criblage des 3120 molécules, une seule s'avère être inhibitrice avec une IC₅₀ de 4 µM. Cependant, au cours de la caractérisation de cette molécule il apparaît que celle-ci est en réalité un mélange de plusieurs espèces que nous avons identifiées au nombre de cinq par spectrométrie de masse. Ainsi, à l'heure actuelle, alors que nous essayons de séparer ces composés, nous ne savons pas laquelle des cinq est réellement inhibitrice mais il est très probable que celle-ci soit un puissant inhibiteur des PLD eucaryotes. Nos travaux de caractérisation tendent, en effet, à montrer que celui-ci est spécifique des PLD à motif HKD.

L'impact de la PLD humaine est largement décrit dans la littérature, souvent dans un cadre pathologique d'ailleurs. Dans la dernière partie de ces travaux de thèse, nous avons cherché à comprendre l'impact de cette enzyme exprimée dans un métabolisme recombinant, en

particulier chez la levure *P. pastoris* utilisée extensivement tout au long de ces travaux. Cette recherche passe par le clonage d'une nouvelle PLD. Il s'agit d'une PLD issue d'un organisme ayant un métabolisme lipidique particulièrement actif, l'algue *Coccomyxa subellipsoidea*. Ainsi, nous avons cloné le gène codant la PLD de *Coccomyxa subellipsoidea* en levure et en bactérie de façon à caractériser cette nouvelle enzyme. Cependant, à ce jour, nous n'avons pas pu détecter d'activité PLD en testant les conditions enzymatiques habituelles des PLD végétales. Alors que cette séquence répond à tous les critères de sélection de l'isoforme α des PLD végétales - même si elle comprend un taux d'identité de séquence relativement bas pour les PLD végétales (50 %) -, il semble ici que son moyen d'expression et de mesure de l'activité enzymatique de la protéine codée soit sensiblement différent des PLD végétales décrites dans la littérature.

Nous avons alors concentré nos efforts sur la détection de l'activité PLD *in vivo*. Le but étant de cribler rapidement et facilement différents niveaux d'activité PLD sur boîte de Petri. Il apparaît un fort bouleversement du métabolisme lipidique dans les levures qui expriment la PLD de *V. unguiculata*. Ce bouleversement n'est pas observé avec la PLD recombinante d'*A. thaliana*, dont on sait cependant que le niveau d'expression est moindre. Nous avons tenté de mettre au point un criblage de l'activité PLD *in vivo* sur boîte. Cependant, malgré la variation des conditions de stress cellulaire, aucun paramètre n'a laissé apparaître une différence entre une souche exprimant une PLD d'une souche contrôle.

C'est avec la levure *S. cerevisiae* que nous avons lancé les prémices d'un criblage de l'activité PLD *in vivo*. Une souche délétée de sa PLD endogène SPO14 possède la caractéristique d'avoir une cinétique de croissance plus rapide qu'une souche sauvage. On observe ainsi une différence phénotypique due à l'absence de la PLD. A l'inverse, une souche délétée ne survit pas en présence d'un lipide particulier : le C16:0 PAF. Par ailleurs, on peut compléter cette souche avec le gène de la PLD endogène et ainsi restaurer un phénotype normal en présence de ce lipide. Après avoir reproduit des données publiées (Kennedy et al., 2011) nous avons essayé de compléter la souche délétée avec la PLD végétale d'*A. thaliana*, mais nous n'avons pas observé la restauration du phénotype sauvage.

Ainsi, nous interrogeons le rôle de la PLD de levure dans le métabolisme et portons actuellement nos recherches sur la PLD endogène de *P. pastoris*, levure dans laquelle nous exprimons avec succès les PLD végétales tout au long de ces travaux de thèse.

C'est donc en suivant le prisme dogmatique de la relation structure-fonction que ces recherches s'attachent à caractériser les PLD eucaryotes. Avec comme outils principaux les PLD végétales et les PLD de levure, nous avons souhaité orienter nos travaux de telle façon qu'ils puissent être transposables aux PLD du vivant, en particulier vers les PLD à motif HKD et notamment la PLD humaine. Cette dernière possède des caractéristiques qui rendent son étude *in vitro* particulièrement difficile, notamment son expression et sa purification en système recombinant. Comme toutes les PLD qui comportent une composante hydrophobe intrinsèque à leur fonction localisée au niveau des membranes cellulaires, la PLD humaine comporte une composante hydrophobe supplémentaire car elle est membranaire. Cependant, ces travaux de thèse montrent que si l'identité de séquence globale est faible, elle est particulièrement importante dans certaines zones localisées. Ainsi, ces enzymes ne partagent, certes, pas d'homologie de séquence mais probablement une homologie de structure tridimensionnelle leur permettant une fonction commune et des propriétés physico-chimiques proches.

Une controverse demeure cependant quant à ces protéines. De multiples études montrent que la délétion du gène codant la PLD dans un organisme vivant ne nuit pas à l'intégrité de la physiologie de celui-ci. Ceci semble indiquer que ces enzymes ne sont pas essentielles dans le vivant. Or, en accord avec les données de la littérature, nos travaux démontrent l'aspect ubiquitaire des PLD chez les plantes et leur remarquable conservation dans le vivant indiquant par là même leur importance au sein du métabolisme.

L'intérêt de l'étude de ces enzymes est grandissant au vue de leur implication dans les métabolismes du vivant. La compréhension fondamentale de leur fonctionnement, et notamment du rôle des zones conservées et l'inhibition spécifique de ce type de protéine, constituera une réelle avancée scientifique dans les domaines de l'étude *in vitro* de protéines membranaires, aussi bien que dans celui de l'enzymologie interfaciale.

5. Références bibliographiques

- Abad, S., Kitz, K., Hörmann, A., Schreiner, U., Hartner, F.S., and Glieder, A. (2010). Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. J.* *5*, 413–420.
- Abdelkafi, S., and Abousalham, A. (2011). The substrate specificities of sunflower and soybean phospholipases D using transphosphatidylation reaction. *Lipids Health Dis.* *10*, 1–7.
- Abdulnour, R.-E.E., Howrylak, J.A., Tavares, A.H., Douda, D.N., Henkels, K.M., Miller, T.E., Fredenburgh, L.E., Baron, R.M., Gomez-Cambronero, J., and Levy, B.D. (2018). Phospholipase D isoforms differentially regulate leukocyte responses to acute lung injury. *J. Leukoc. Biol.* *103*, 919–932.
- Abergel, C., Abousalham, A., Chenivesse, S., Rivière, M., Moustacas-Gardies, A.-M., and Verger, R. (2001). Crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct.* *57*, 320–322.
- Abousalham, A., Riviere, M., Teissere, M., and Verger, R. (1993). Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* *1158*, 1–7.
- Abousalham, A., Teissere, M., Gardies, A.-M., Verger, R., and Noat, G. (1995). Phospholipase D from Soybean (*Glycine max* L.) Suspension-Cultured Cells: Purification, Structural and Enzymatic Properties. *Plant Cell Physiol.* *36*, 989–996.
- Abousalham, A., Nari, J., Teissere, M., Ferte, N., Noat, G., and Verger, R. (1997a). Study of Fatty Acid Specificity of Sunflower Phospholipase D using Detergent/Phospholipid Micelles. *Eur. J. Biochem.* *248*, 374–379.
- Abousalham, A., Liossis, C., O'Brien, L., and Brindley, D.N. (1997b). Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA. *J. Biol. Chem.* *272*, 1069–1075.
- Abousalham, A., Hobman, T.C., Dewald, J., Garbutt, M., and Brindley, D.N. (2002). Cell-permeable ceramides preferentially inhibit coated vesicle formation and exocytosis in Chinese

hamster ovary compared with Madin-Darby canine kidney cells by preventing the membrane association of ADP-ribosylation factor. *Biochem. J.* 361, 653–661.

Ali, W.H., Chen, Q., Delgiorno, K.E., Su, W., Hall, J.C., Hongu, T., Tian, H., Kanaho, Y., Di Paolo, G., Crawford, H.C., et al. (2013). Deficiencies of the Lipid-Signaling Enzymes Phospholipase D1 and D2 Alter Cytoskeletal Organization, Macrophage Phagocytosis, and Cytokine-Stimulated Neutrophil Recruitment. *PLoS One* 8, 1–11.

Allen, J.W., DiRusso, C.C., and Black, P.N. (2017). Carbon and Acyl Chain Flux during Stress-induced Triglyceride Accumulation by Stable Isotopic Labeling of the Polar Microalga *Coccomyxa subellipsoidea* C169. *J. Biochem.* 292, 361–374.

Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An Overview. In *Lipases and Phospholipases*, G. Sandoval, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 69–105.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Ames, G.F. (1968). Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: Structure and Metabolism. *J. Bacteriol.* 95, 833–843.

Andrews, B., Bond, K., Lehman, J.A., Horn, J.M., Dugan, A., and Gomez-Cambronero, J. (2000). Direct inhibition of in vitro PLD activity by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 302–311.

Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., and White, F.H. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47, 1309–1314.

Aoki, J., Inoue, A., Makide, K., Saiki, N., and Arai, H. (2007). Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89, 197–204.

Arhab, Y., Rahier, R., Noiriél, A., Cherrier, M.V., and Abousalham, A. (2018). Expression and Purification of Recombinant *Vigna unguiculata* Phospholipase D in *Pichia pastoris* for

Structural Studies. In *Lipases and Phospholipases*, G. Sandoval, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 191–201.

Artiss, J.D., Draisey, T.F., Thibert, R.J., and Taylor, K.E. (1979). A procedure for the direct determination of micromolar quantities of lecithin employing enzymes as reagents. *Microchem J.* *24*, 239–258.

Austin-Brown, S.L., and Chapman, K.D. (2002). Inhibition of Phospholipase D alpha by N-Acylethanolamines. *Plant Physiol.* *129*, 1892–1898.

Beligni, M.V., Bagnato, C., Prados, M.B., Bondino, H., Laxalt, A.M., Munnik, T., and Ten Have, A. (2015). The diversity of algal phospholipase D homologs revealed by biocomputational analysis. *J. Phycol.* *51*, 943–962.

Ben Ali, Y., Carrière, F., and Abousalham, A. (2007). High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Expr. Purif.* *51*, 162–169.

Blanc, G., Agarkova, I., Grimwood, J., Kuo, A., Brueggeman, A., Dunigan, D.D., Gurnon, J., Ladunga, I., Lindquist, E., Lucas, S., et al. (2012). The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biol.* *13*, 1–12.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A Rapid Method Of Total Lipid Extraction And Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* *37*, 1–7.

Blöchliger, E., Blocher, M., Walde, P., and Luisi, P.L. (1998). Matrix Effect in the Size Distribution of Fatty Acid Vesicles. *J. Phys. Chem.* *102*, 10383–10390.

Borkenhagen, L.F., and Kennedy, E.P. (1958). The enzymic equilibration of L-serine with O-phospho-L-serine. *Biochim. Biophys. Acta* *28*, 222–223.

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

Bretthauer, R.K., and Castellino, F.J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris* derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem* *30*, 193–200.

- Brown, H.A., Gutowski, S., Kahn, R.A., and Sternweis, P.C. (1995). Partial purification and characterization of Arf-sensitive phospholipase D from porcine brain. *J. Biol. Chem.* *270*, 14935–14943.
- Brown, H.A., Henage, L.G., Preininger, A.M., Xiang, Y., and Exton, J.H. (2007). Biochemical Analysis of Phospholipase D. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 49–87.
- Brown, H.A., Thomas, P.G., and Lindsley, C.W. (2017). Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 351–367.
- Bruntz, R.C., Lindsley, C.W., and Brown, H.A. (2014a). Phospholipase D Signaling Pathways and Phosphatidic Acid as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacol. Rev.* *66*, 1033–1079.
- Bruntz, R.C., Taylor, H.E., Lindsley, C.W., and Brown, H.A. (2014b). Phospholipase D₂ Mediates Survival Signaling through Direct Regulation of Akt in Glioblastoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 600–616.
- Burkhardt, U., Stegner, D., Hattingen, E., Beyer, S., Nieswandt, B., and Klein, J. (2014). Impaired brain development and reduced cognitive function in phospholipase D-deficient mice. *Neurosci. Lett.* *572*, 48–52.
- Channon, H.J., and Chibnall, A.C. (1929). The ether-soluble substances of cabbage leaf cytoplasm: The isolation of n-nonacosane and di-n-tetradecyl ketone. *Biochem. J.* *23*, 168–175.
- Chen, Q., Hongu, T., Sato, T., Zhang, Y., Ali, W., Cavallo, J.-A., van der Velden, A., Tian, H., Di Paolo, G., Nieswandt, B., et al. (2012). Key Roles for the Lipid Signaling Enzyme Phospholipase D1 in the Tumor Microenvironment During Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Sci. Signal.* *5*, 1–21.
- Chen, S.C.A., Wright, L.C., Santangelo, R.T., Muller, M., Moran, V.R., Kuchel, P.W., and Sorell, T.C. (1997). Identification of Extracellular Phospholipase B, Lysophospholipase, and Acyltransferase Produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* *65*, 1–7.
- Cho, E.Y., Yun, C.-H., Chae, H.-Z., Chae, H.-J., and Ahn, T. (2008). Lysophosphatidylserine-induced functional switch of human cytochrome P450 1A2 and 2E1 from monooxygenase to phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 584–589.

- Chouard, T. (2011). If dogma dictates that proteins need a structure to function, then why do so many of them live in a state of disorder? *Nature* 469, 151–153.
- Colley, W.C., Sung, T.-C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshuler, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol.* 7, 191–201.
- Conde, M.A., Alza, N.P., Iglesias González, P.A., Scodelaro Bilbao, P.G., Sánchez Campos, S., Uranga, R.M., and Salvador, G.A. (2018). Phospholipase D1 downregulation by α -synuclein: Implications for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1863, 639–650.
- Contardi, A., and Ercoli, A. (1933). The enzymic cleavage of lecithin and lysolecithin. *Biochem. Z.* 261, 275–302.
- Coronado, M.A., Ullah, A., da Silva, L.S., Chaves-Moreira, D., Vuitika, L., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Chahine, J., Murakami, M.T., and Arni, R.K. (2015). Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 768–774.
- Damnjanović, J., Nakano, H., and Iwasaki, Y. (2014). Deletion of a dynamic surface loop improves stability and changes kinetic behavior of phosphatidylinositol-synthesizing *Streptomyces* phospholipase D: Loop Deletion Improves Stability of PLD. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 674–682.
- Davidson, F., M., and Long, C. (1958). Action of cabbage leaf phospholipase D on ovolecithin and related substances. *Biochem. J.* 69, 458–466.
- De Ghellinck, A., Schaller, H., Laux, V., Haertlein, M., Sferrazza, M., Maréchal, E., Wacklin, H., Jouhet, J., and Fragneto, G. (2014). Production and Analysis of Perdeuterated Lipids from *Pichia pastoris* Cells. *PLoS One* 9, e92999.
- De Giuseppe, P.O., Ullah, A., Silva, D.T., Gremski, L.H., Wille, A.C.M., Chaves Moreira, D., Ribeiro, A.S., Chaim, O.M., Murakami, M.T., Veiga, S.S., et al. (2011). Structure of a novel

class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *409*, 622–627.

Deng, L., Sugiura, R., Takeuchi, M., Suzuki, M., Ebina, H., Takami, T., Koike, A., Iba, S., and Kuno, T. (2006). Real-Time Monitoring of Calcineurin Activity in Living Cells: Evidence for Two Distinct Ca²⁺-dependent Pathways in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4790–4800.

Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G.M., and Posewitz, M.C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 235–240.

Do, L.D., Buchet, R., Pikula, S., Abousalham, A., and Mebarek, S. (2012). Direct determination of phospholipase D activity by infrared spectroscopy. *Anal. Biochem.* *430*, 32–38.

Dong, D., Lei, M., Hua, P., Pan, Y.-H., Mu, S., Zheng, G., Pang, E., Lin, K., and Zhang, S. (2017). The Genomes of Two Bat Species with Long Constant Frequency Echolocation Calls. *Mol. Biol. Evol.* *34*, 20–34.

Dyer, J.H., Zheng, L., and Wang, X. (1995). Cloning and Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding Phospholipase D from *Arabidopsis* (Accession No. U36381). *Plant Physiol.* *109*, 1497.

Edwards, J.L., Entz, D.D., and Apicella, M.A. (2003). Gonococcal Phospholipase D Modulates the Expression and Function of Complement Receptor 3 in Primary Cervical Epithelial Cells. *Infect. Immun.* *71*, 6381–6391.

Eftekharian, M.M., Azimi, T., Ghafouri-Fard, S., Sayad, A., Omrani, M.D., Sarrafzadeh, S., Abbasalipourkabir, R., Mazdeh, M., and Taheri, M. (2017). Phospholipase D1 expression analysis in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* *38*, 865–872.

Eisen, S.F., and Brown, H.A. (2002). Selective Estrogen Receptor (ER) Modulators Differentially Regulate Phospholipase D Catalytic Activity in ER-Negative Breast Cancer Cells. *Mol. Pharmacol.* *62*, 911–920.

El Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., Gareil, M., d'Arcy-Lameta, A., and Pham-Thi, T. (1999). Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L.Walp. differing in drought tolerance. *Plant Mol.Biol.* *39*, 1257–1265.

- El Maarouf, H., Carrière, F., Rivière, M., and Abousalham, A. (2000). Functional expression in insect cells, one-step purification and characterization of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Eng.* *13*, 811–817.
- Engelman, D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* *438*, 578–580.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., et al. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* *46*, 839–862.
- Fan, L., Zheng, S., and Wang, X. (1997). Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell.* *9*, 2183–2196.
- Frohman, M.A., Sung, T.-C., and Morris, A.J. (1999). Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* *1439*, 175–186.
- Ganesan, R., Mahankali, M., Alter, G., and Gomez-Cambronero, J. (2015). Two sites of action for PLD2 inhibitors: The enzyme catalytic center and an allosteric, phosphoinositide binding pocket. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* *1851*, 261–272.
- Ge, F., Huang, W., Chen, Z., Zhang, C., Xiong, Q., Bowler, C., Yang, J., Xu, J., and Hu, H. (2014). Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Regulates Triacylglycerol Accumulation in the Model Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell.* *26*, 1681–1697.
- Gibson, T.J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M., and Birney, E. (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends in Biochemical Sciences* *19*, 349–353.
- Göbel, K., Schuhmann, M.K., Pankratz, S., Stegner, D., Herrmann, A.M., Braun, A., Breuer, J., Bittner, S., Ruck, T., Wiendl, H., et al. (2014). Phospholipase D1 mediates lymphocyte adhesion and migration in experimental autoimmune encephalomyelitis: Clinical immunology. *Eur. J. Immunol.* *44*, 2295–2305.
- Gomez-Cambronero, J. (2014). Phospholipase D in Cell Signaling: From a Myriad of Cell Functions to Cancer Growth and Metastasis. *J. Biol. Chem.* *289*, 22557–22566.

- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* *40*, D1178-1186.
- Hammond, S.M., Altshuller, Y., Sung, T.-C., Rudge, S.A., Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1995). Human ADP-ribosylation Factor-activated Phosphatidylcholine-specific Phospholipase D Defines a New and Highly Conserved Gene Family. *J. Biol. Chem.* *270*, 29640–29643.
- Hanahan, D.J. (1947). The Lecithinases. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* *4*, 141–176.
- Hanahan, D.J., and Chaikoff, I.L. (1947a). The Phosphorus Containing Lipides Of The Carrot. *J. Biol. Chem* *168*, 9.
- Hanahan, D.J., and Chaikoff, I.L. (1947b). A new phospholipide splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J. Biol. Chem* *169*, 8.
- Hanahan, D.J., and Chaikoff, I.L. (1948). On the nature of the phosphorus containing lipides of cabbage leaves and their relation to a phospholipide splitting enzyme contained in these leaves. *J. Biol. Chem* *172*, 9.
- Haouas, A., Hamadi, N.B., and Msaddek, M. (2015). Synthesis of New Spirocyclopropane and Oxadiazole Products: Cycloaddition. *J. Heterocycl. Chem.* *52*, 1765–1768.
- Harkins, A.L., London, S.D., and Dolan, J.W. (2008). An upstream regulator and downstream target of phospholipase D1 activity during pheromone response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* *8*, 237–244.
- Harkins, A.L., Yuan, G., London, S.D., and Dolan, J.W. (2010). An oleate-stimulated, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-independent phospholipase D in *Schizosaccharomyces pombe*: Characterizing phospholipase D1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* *10*, 717–726.

- Hausmann, J., Kamtekar, S., Christodoulou, E., Day, J.E., Wu, T., Fulkerson, Z., Albers, H.M.H.G., van Meeteren, L.A., Houben, A.J.S., van Zeijl, L., et al. (2011). Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 198–204.
- Heller, M. (1978). Phospholipase D. *Adv. Lipid. Res.* *16*, 267–326.
- Henkels, K.M., Boivin, G.P., Dudley, E.S., Berberich, S.J., and Gomez-Cambronero, J. (2013). Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model. *Oncogene* *32*, 5551–5562.
- Hinnebusch, B.J. (2002). Role of Yersinia Murine Toxin in Survival of *Yersinia pestis* in the Midgut of the Flea Vector. *Science* *296*, 733–735.
- Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R.W., and Shayman, J.A. (2006). Lysosomal Phospholipase A2 and Phospholipidosis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6139–6148.
- Hirashima, T., Toyoshima, M., Moriyama, T., and Sato, N. (2018). Evolution of the Phosphatidylcholine Biosynthesis Pathways in Green Algae: Combinatorial Diversity of Methyltransferases. *J. Mol. Evol.* *86*, 68–76.
- Holm-Hansen, O. (1964). Isolation and Culture of Terrestrial and Fresh-water Algae of Antarctica. *Phycologia* *4*, 43–51.
- Hough, E., Hansen, L.K., Birknes, B., Jynge, K., Hansen, S., Hordvik, A., Little, C., Dodson, E., and Derewenda, Z. (1989). High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature* *338*, 357–360.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* *54*, 621–639.
- Imamura, S., and Horiuti, Y. (1978). Enzymatic Determination Of PLD Activity With Choline Oxydase. *J. Biochem.* *83*, 677–680.
- Iwasaki, Y., Nakano, H., and Yamane, T. (1999a). Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *42*, 290–299.

- Iwasaki, Y., Horiike, S., Matsushima, K., and Yamane, T. (1999b). Location of the catalytic nucleophile of phospholipase D of *Streptomyces antibioticus* in the C-terminal half domain. *European Journal of Biochemistry* 264, 577–581.
- Jang, Y.H., and Min, D.S. (2012). The hydrophobic amino acids involved in the interdomain association of phospholipase D1 regulate the shuttling of phospholipase D1 from vesicular organelles into the nucleus. *Exp. Mol. Med.* 44, 571.
- Jin, J.-K., Ahn, B.-H., Na, Y.-J., Kim, J.-I., Kim, Y.-S., Choi, E.-K., Ko, Y.-G., Chung, K.C., Kozłowski, P.B., and Min, D.S. (2007). Phospholipase D1 is associated with amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 1015–1027.
- Jones, D.T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195–202.
- Jones, S.B., Pfeifer, L.A., Bleisch, T.J., Beauchamp, T.J., Durbin, J.D., Klimkowski, V.J., Hughes, N.E., Rito, C.J., Dao, Y., Gruber, J.M., et al. (2016). Novel Autotaxin Inhibitors for the Treatment of Osteoarthritis Pain: Lead Optimization via Structure-Based Drug Design. *ACS Med. Chem. Lett.* 7, 857–861.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., and Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* 17, 16–23.
- Kanfer, J.N., Sorrentino, G., and Sitar, D.S. (1998). Phospholipases as mediators of amyloid beta peptide neurotoxicity: an early event contributing to neurodegeneration characteristic of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 257, 93–96.
- Kang, D.W., Park, M.H., Lee, Y.J., Kim, H.S., Kwon, T.K., Park, W.-S., and Min, D.S. (2008). Phorbol Ester Up-regulates Phospholipase D1 but Not Phospholipase D2 Expression through a PKC/Ras/ERK/NFκB-dependent Pathway and Enhances Matrix Metalloproteinase-9 Secretion in Colon Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 4094–4104.
- Kater, L.A., Goetzl, E.J., and Austen, K.F. (1976). Isolation of human eosinophil phospholipase D. *J. Clin. Invest.* 57, 1173–1180.

- Kato, K., Ikeda, H., Miyakawa, S., Futakawa, S., Nonaka, Y., Fujiwara, M., Okudaira, S., Kano, K., Aoki, J., Morita, J., et al. (2016). Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 395–401.
- Kayal, W.E., Paliyath, G., Sullivan, J.A., and Subramanian, J. (2017). Phospholipase D inhibition by hexanal is associated with calcium signal transduction events in raspberry. *Hortic. Res.-England* *4*, 17042.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* *10*, 845–858.
- Kennedy, M.A., Kabbani, N., Lambert, J.-P., Swayne, L.A., Ahmed, F., Figeys, D., Bennett, S.A.L., Bryan, J., and Baetz, K. (2011). Srf1 Is a Novel Regulator of Phospholipase D Activity and Is Essential to Buffer the Toxic Effects of C16:0 Platelet Activating Factor. *PLoS Genet.* *7*, e1001299.
- Khatib, A., Arhab, Y., Bentebibel, A., Abousalham, A., and Noiriél, A. (2016). Reassessing the Potential Activities of Plant CGI-58 Protein. *PLoS One* *11*, 1–20.
- Khatoon, H., Mansfeld, J., Schierhorn, A., and Ulbrich-Hofmann, R. (2015). Purification, sequencing and characterization of phospholipase D from Indian mustard seeds. *Phytochemistry* *117*, 65–75.
- Kienesberger, P.C., Oberer, M., Lass, A., and Zechner, R. (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J. Lipid Res.* *50*, S63–S68.
- Kim, D.-U., Roh, T., Lee, J., Noh, J., Jang, Y.-J., Hoe, K.-L., Yoo, H.-S., and Choi, M.-U. (1999). Molecular cloning and functional expression of a phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Biochim. Biophys. Acta* *1437*, 409–414.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* *12*, 1067–1078.
- Koonin, E.V. (1996). A Duplicated Catalytic Motif In A New Superfamily Of Phosphohydrolases And Phospholipid Synthases That Includes Poxvirus Envelope Proteins. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 242–243.

- Koshland, D.E. (1994). The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 33, 2375–2378.
- Kulkarni, A., Quang, P., Curry, V., Keyes, R., Zhou, W., Cho, H., Baffoe, J., Török, B., and Stieglitz, K. (2014). 1,3-Disubstituted-4-Aminopyrazolo [3, 4-d] Pyrimidines, a New Class of Potent Inhibitors for Phospholipase D. *Chemical Biology & Drug Design* 84, 270–281.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage Of Structural Proteines During the assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Laibach, F. (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot. Arch.* 44, 439–455.
- Lajoie, D.M., Roberts, S.A., Zobel-Thropp, P.A., Delahaye, J.L., Bandarian, V., Binford, G.J., and Cordes, M.H.J. (2015). Variable Substrate Preference among Phospholipase D Toxins from Sicariid Spiders. *J. Biol. Chem.* 290, 10994–11007.
- Lambrecht, R., and Ulbrich-Hofmann, R. (1992). A Facile Purification Procedure of Phospholipase D from Cabbage and its Characterization. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 81–88.
- Lavieri, R.R. (2014). Synthesis, Development And Biochemical Characterization Of Small Molecule, Isoform-Selective PLD Inhibitor And Photoactive Probes. Vanderbilt University.
- Lein, W., and Saalbach, G. (2001). Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1530, 172–183.
- Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S., and Hough, E. (2000). The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* 8, 655–667.
- Leiros, I., McSweeney, S., and Hough, E. (2004). The Reaction Mechanism of Phospholipase D from *Streptomyces* sp. Strain PMF. Snapshots along the Reaction Pathway Reveal a Pentacoordinate Reaction Intermediate and an Unexpected Final Product. *J. Mol. Biol.* 339, 805–820.
- Lerchner, A., Mansfeld, J., Schäffner, I., Schöps, R., Beer, H.K., and Ulbrich-Hofmann, R. (2005). Two highly homologous phospholipase D isoenzymes from *Papaver somniferum* L.

with different transphosphatidylation potential. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1737, 94–101.

Lerchner, A., Mansfeld, J., Kuppe, K., and Ulbrich-Hofmann, R. (2006). Probing conserved amino acids in phospholipase D (*Brassica oleracea var. capitata*) for their importance in hydrolysis and transphosphatidylation activity. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 443–452.

Leslie, C.C. (2015). Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* 56, 1386–1402.

Lewis, J.A., Scott, S.A., Lavieri, R., Buck, J.R., Selvy, P.E., Stoops, S.L., Armstrong, M.D., Brown, H.A., and Lindsley, C.W. (2009). Design and synthesis of isoform-selective phospholipase D (PLD) inhibitors. Part I: Impact of alternative halogenated privileged structures for PLD1 specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 1916–1920.

Li, X., Liu, Z., Wang, G., Pan, D., Jiao, L., and Yan, Y. (2016). Overexpression of *Candida rugosa* lipase Lip1 via combined strategies in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 82, 115–124.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Löoke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 50, 325–328.

Loonen, A.J.M., and Soudijn, W. (1985). Halopemide, a new psychotropic agent: Cerebral distribution and receptor interactions. *Pharm. Weekbl. Sci.* 7, 1–9.

Madesh, M., and Balasubramanian, K.A. (1998). Cyclosporin A inhibits oxidant and calcium stimulated phospholipase D activity in the rat intestinal mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metab.* 1389, 206–212.

Madesh, M., Ibrahim, S., and Balasubramanian, K. (1997). Phospholipase D Activity in the Intestinal Mitochondria: Activation by Oxygen Free Radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 271–277.

- Mad'iarov, S.R. (1976). Isolation of phospholipase D from cotton seeds. *Biokhimiia* 41, 255–259.
- Magalhães, G.S., Caporrino, M.C., Della-Casa, M.S., Kimura, L.F., Prezotto-Neto, J.P., Fukuda, D.A., Portes-Junior, J.A., Neves-Ferreira, A.G.C., Santoro, M.L., and Barbaro, K.C. (2013). Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie* 95, 1773–1783.
- Magotti, P., Bauer, I., Igarashi, M., Babagoli, M., Marotta, R., Piomelli, D., and Garau, G. (2015). Structure of Human N -Acylphosphatidylethanolamine-Hydrolyzing Phospholipase D: Regulation of Fatty Acid Ethanolamide Biosynthesis by Bile Acids. *Structure* 23, 598–604.
- Martin, S.F., DeBlanc, R.L., and Hergenrother, P.J. (2000). Determination of the substrate specificity of the phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* via an inorganic phosphate quantitation assay. *Anal. Biochem.* 278, 106–110.
- Matsumoto, Y., and Sugimori, D. (2015). Substrate recognition mechanism of *Streptomyces* phospholipase D and enzymatic measurement of plasmalogen. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 372–379.
- Mazorra-Manzano, M.A., Ramírez-Suarez, J.C., and Yada, R.Y. (2017). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–17.
- McLain, N., and Dolan, J.W. (1997). Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 3521–3526.
- Meyerowitz, E.M., and Pruitt, R.E. (1985). *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science* 229, 1214–1218.
- Mikami, K., Li, L., Takahashi, M., and Saga, N. (2009). Photosynthesis-dependent Ca²⁺ influx and functional diversity between phospholipases in the formation of cell polarity in migrating cells of red algae. *Plant Signal. Behav.* 4, 911–913.
- Monovich, L., Mugrage, B., Quadros, E., Toscano, K., Tommasi, R., LaVoie, S., Liu, E., Du, Z., LaSala, D., Boyar, W., et al. (2007). Optimization of Halopemide for Phospholipase D2 inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2310–2311.

- Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J., and de Laat, S.W. (1986). Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 323, 171–173.
- Moreno-Pérez, A.J., Martínez-Force, E., Garcés, R., and Salas, J.J. (2010). Phospholipase D α from sunflower (*Helianthus annuus*): cloning and functional characterization. *J. Plant Physiol.* 167, 503–511.
- Morrison, K.L., and Weiss, G.A. (2001). Combinatorial alanine-scanning. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 302–307.
- Mukadam, A.S., Breusegem, S.Y., and Seaman, M.N.J. (2018). Analysis of novel endosome-to-Golgi retrieval genes reveals a role for PLD3 in regulating endosomal protein sorting and amyloid precursor protein processing. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2613–2625.
- Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., and Taketomi, Y. (2015). A new era of secreted phospholipase A2. *J. Lipid Res.* 56, 1248–1261.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., de Andrade, S.A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D.V., and Arni, R.K. (2006). Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 323–329.
- Nakanishi, H., de los Santos, P., and Neiman, A.M. (2004). Positive and Negative Regulation of a SNARE Protein by Control of Intracellular Localization. *Mol. Biol. Cell* 15, 1802–1815.
- Nakazawa, Y., Sato, H., Uchino, M., and Takano, K. (2006). Purification, Characterization and Cloning of Phospholipase D from Peanut Seeds. *Protein J.* 25, 212–223.
- Nelson, R.K., and Frohman, M.A. (2015). Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *J. Lipid Res.* 56, 2229–2237.
- Neuhaus, F.C., and Byrne, W.L. (1958). O-Phosphoserine phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 28, 223–224.
- Nishizuka, Y. (1988). The Molecular Heterogeneity Of Protein Kinase C And Its Implications For Cellular Regulation. *Nature* 334, 661–665.

- Novotna, Z., KG, J., Daussant, J., Sajdok, J., and Valentov, O. (1999). Purification and characterisation of rape seed phospholipase D. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 531–537.
- Oblozinsky, M., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R., and Bezakova, L. (2003). Two uncommon phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (*Papaver somniferum L.*). *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1631, 153–159.
- Ogino, C., Daido, H., Ohmura, Y., Takada, N., Itou, Y., Kondo, A., Fukuda, H., and Shimizu, N. (2007). Remarkable enhancement in PLD activity from *Streptovercillium cinnamoneum* by substituting serine residue into the GG/GS motif. *BBA-Proteins Proteomics* 1774, 671–678.
- Okamoto, Y., Tsuboi, K., and Ueda, N. (2009). Chapter 1: Enzymatic Formation of Anandamide. In *Vitamins & Hormones*, (Elsevier), pp. 1–24.
- Okawa, Y., and Yamagushi, T. (1975). Purification and Properties of *Streptomyces hachijoensis* Phospholipase D2. *J. Biochem.* 78, 10.
- Oliveira, T.G., Chan, R.B., Tian, H., Laredo, M., Shui, G., Staniszewski, A., Zhang, H., Wang, L., Kim, T.-W., Duff, K.E., et al. (2010). Phospholipase D2 Ablation Ameliorates Alzheimer's Disease-Linked Synaptic Dysfunction and Cognitive Deficits. *J. Neurosci.* 30, 16419–16428.
- Orth, E.S., Brandão, T.A.S., Souza, B.S., Pliego, J.R., Vaz, B.G., Eberlin, M.N., Kirby, A.J., and Nome, F. (2010). Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8513–8523.
- Paliyath, G., Pinhero, R.G., Yada, R.Y., and Murr, D.P. (1999). Effect of Processing Conditions on Phospholipase D Activity of Corn Kernel Subcellular Fractions. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2579–2588.
- Pappan, K., Zheng, S., and Wang, X. (1997). Identification and Characterization of a Novel Plant Phospholipase D That Requires Polyphosphoinositides and Submicromolar Calcium for Activity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem* 272, 7048–7054.
- Pappan, K., Zheng, L., Krishnamoorthi, R., and Wang, X. (2004). Evidence for and Characterization of Ca²⁺ Binding to the Catalytic Region of *Arabidopsis thaliana* Phospholipase D β . *J. Biol. Chem* 279, 47833–47839.

- Peetla, C., Vijayaraghavalu, S., and Labhassetwar, V. (2013). Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *65*, 1686–1698.
- Peters, D.M., Vadasz, I., Wujak, L., Wygrecka, M., Olschewski, A., Becker, C., Herold, S., Papp, R., Mayer, K., Rummel, S., et al. (2014). TGF-beta directs trafficking of the epithelial sodium channel ENaC which has implications for ion and fluid transport in acute lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, E374–E383.
- Pleskot, R., Potocký, M., Pejchar, P., Linek, J., Bezvoda, R., Martinec, J., Valentová, O., Novotná, Z., and Žárský, V. (2010). Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton: Reciprocal regulation of plant PLD and actin. *Plant J.* *62*, 494–507.
- Ponting, C.P., and Kerr, I.D. (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 Sci.* *5*, 914–922.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* *216*, 136–144.
- Rahier, R., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2016a). Functional Characterization of the N-Terminal C2 Domain from *Arabidopsis thaliana* Phospholipase D α and D β . *Biomed Res. Int.* *2016*, 1–15.
- Rahier, R., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2016b). Development of a Direct and Continuous Phospholipase D Assay Based on the Chelation-Enhanced Fluorescence Property of 8-Hydroxyquinoline. *Anal. Chem.* *88*, 666–674.
- Rahier, R., Abla, H., Arhab, Y., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2018). Direct and Continuous Measurement of Phospholipase D Activities Using the Chelation-Enhanced Fluorescence Property of 8-Hydroxyquinoline. In *Lipases and Phospholipases*, G. Sandoval, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 129–138.
- Randall, R.W., Bonser, R.W., Thomson, N.T., and Garland, L.G. (1990). A novel and sensitive assay for phospholipase D in intact cells. *FEBS Lett.* *264*, 87–90.

- Rose, K., Rudge, S.A., Frohman, M.A., Morris, A.J., and Engebrecht, J. (1995). Phospholipase D signaling is essential for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 12151–12155.
- Rudge, S.A., Zhou, C., and Engebrecht, J. (2002). Differential Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Phospholipase D in Sporulation and Sec14-Independent Secretion. *Genetics* *160*, 1353–1361.
- Rudolph, A.E., Stuckey, J.A., Zhao, Y., Matthews, H.R., Patton, W.A., Moss, J., and Dixon, J.E. (1999). Expression, Characterization, and Mutagenesis of the *Yersinia pestis* Murine Toxin, a Phospholipase D Superfamily Member. *J. Biol. Chem.* *274*, 11824–11831.
- Saidani, N., Botte, C.Y., Deligny, M., Bonneau, A.-L., Reader, J., Lasselin, R., Merer, G., Niepceon, A., Brossier, F., Cintrat, J.-C., et al. (2014). Discovery of Compounds Blocking the Proliferation of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* in a Chemical Space Based on Piperidinyl-Benzimidazolone Analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 2586–2597.
- Sato, H., Watanabe, T., Sagane, Y., Nakazawa, Y., and Takano, K. (2000). Purification and Characterization of Phospholipase D from Cabbage Leaves. *Food Sci. Technol. Res.* *6*, 29–33.
- Sato, N., Mori, N., Hirashima, T., and Moriyama, T. (2016). Diverse pathways of phosphatidylcholine biosynthesis in algae as estimated by labeling studies and genomic sequence analysis. *Plant J.* *87*, 281–292.
- Schäffner, I., Rücknagel, K.-P., Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2002). Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *104*, 79–87.
- Schöps, R., Schierhorn, A., Schäffner, I., Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2002). Identification of Phospholipase D from Cabbage as N-Terminally Acetylated PLD2. *J. Protein. Chem.* *21*, 407–411.
- Schwarzans, J.-P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016). Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb. Cell. Fact.* *15*, 15.

- Sciorra, V.A., Hammond, S.M., and Morris, A.J. (2001). Potent direct inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by calphostin-c. *Biochemistry* 40, 2640–2646.
- Scott, S.A., Selvy, P.E., Buck, J.R., Cho, H.P., Criswell, T.L., Thomas, A.L., Armstrong, M.D., Arteaga, C.L., Lindsley, C.W., and Brown, H.A. (2009). Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat. Chem. Biol.* 5, 108–117.
- Selvy, P.E., Lavieri, R.R., Lindsley, C.W., and Brown, H.A. (2011). Phospholipase D: Enzymology, Functionality, and Chemical Modulation. *Chem. Rev.* 111, 6064–6119.
- Simões, I., Mueller, E.-C., Otto, A., Bur, D., Cheung, A.Y., Faro, C., and Pires, E. (2005). Molecular analysis of the interaction between cardosin A and phospholipase D α : Identification of RGD/KGE sequences as binding motifs for C2 domains. *FEBS J.* 272, 5786–5798.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Smith, R.H. (1954). The phosphatides of the latex of *Hevea brasiliensis* . 1. Biochemical changes. *Biochem. J.* 56, 240–250.
- Sorger, D., and Daum, G. (2003). Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 289–299.
- Souček, A., Michalec, č., and Součková, A. (1967). Enzymic hydrolysis of sphingomyelins by a toxin of *Corynebacterium ovis*. *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metab.* 144, 180–182.
- Spencer, C., and Brown, H.A. (2015). Biochemical Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Phospholipase D. *Biochemistry* 54, 1208–1218.
- Stuckey, J.A., and Dixon, J.E. (1999). Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat. Struct. Biol.* 6, 7.
- Stumpe, S., König, S., and Ulbrich-Hofmann, R. (2007). Insights into the structure of plant α -type phospholipase D: Structure of plant phospholipase D. *FEBS J.* 274, 2630–2640.

- Su, W., Yeku, O., Olepu, S., Genna, A., Park, J.-S., Ren, H., Du, G., Gelb, M.H., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (2009). 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a Phospholipase D Pharmacological Inhibitor That Alters Cell Spreading and Inhibits Chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* 75, 437–446.
- Sugars, J.M., Celtek, S., Manifava, M., Coadwell, J., and Ktistakis, N.T. (1999). Fatty Acylation of Phospholipase D1 on Cysteine Residues 240 and 241 Determines Localization on Intracellular Membranes. *J. Biol. Chem.* 274, 30023–30027.
- Sung, T.-C. (1997). Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.* 16, 4519–4530.
- Sung, T.-C., Zhang, Y., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1999a). Structural Analysis of Human Phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* 274, 3659–3666.
- Sung, T.-C., Altshuler, Y.M., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1999b). Molecular Analysis of Mammalian Phospholipase D2. *J. Biol. Chem.* 274, 494–502.
- Svergun, D.I. (1999). Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* 76, 2879–2886.
- Svergun, D.I., and Koch, M.H.J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.* 66, 1735.
- Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., and Koch, M.H. (2001). Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* 80, 2946–2953.
- Szostak, J.W., Bartel, D.P., and Luisi, P.L. (2001). Synthesizing life. *Nature* 409, 387–390.
- Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T., and Tanimizu, I. (1977). A New Enzymatic Method For Determination Of Serum Choline-Containing Phospholipids. *Clin. Chim. Acta* 79, 93–98.
- Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., van den Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo, P.S., Alves, E.W., and Da Silva, W.D. (1998). Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 366–373.

- Taylor, K.E., Thibert, R.J., and Artiss, J.D. (1982). Enzymatic determination of phosphatidylcholine in human erythrocyte membranes. *Microchem J.* 27, 583–591.
- Tiwari, K., and Paliyath, G. (2011). Microarray analysis of ripening-regulated gene expression and its modulation by 1-MCP and hexanal. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 329–340.
- Tookey, H.L., and Balls, A.K. (1956a). Plant phospholipase D, 1 studies on cottonseed and cabbage phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 218, 213–224.
- Tookey, H.L., and Balls, A.K. (1956b). Plant phospholipase D, 2 inhibition of succinic oxidase by cottonseed phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 220, 15–23.
- Tsuda, S., Okudaira, S., Moriya-Ito, K., Shimamoto, C., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H., Murakami-Murofushi, K., and Kobayashi, T. (2006). Cyclic Phosphatidic Acid Is Produced by Autotaxin in Blood. *J. Biol. Chem.* 281, 26081–26088.
- Ueki, J., Morioka, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (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 Physiol.* 36, 903–914.
- Uesugi, Y., Mori, K., Arima, J., Iwabuchi, M., and Hatanaka, T. (2005). Recognition of Phospholipids in *Streptomyces* Phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 280, 26143–26151.
- Ullah, A., de Giuseppe, P.O., Murakami, M.T., Trevisan-Silva, D., Wille, A.C.M., Chaves-Moreira, D., Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Sennf-Ribeiro, A., Chaim, O.M., et al. (2011). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Commun.* 67, 234–236.
- Uwajima, T., Akita, H., Ito, K., Mihara, A., Aisaka, K., and Terada, O. (1980). Formation and Purification of a New Enzyme, Glycerol Oxidase and Stoichiometry of the Enzyme Reaction. *Agric. Biol. Chem.* 44, 399–406.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124.
- Waite, M. (1999). The PLD superfamily: insights into catalysis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1439, 187–197.

- Waksman, M., Eli, Y., Liscovitch, M., and Gerst, J.E. (1996). Identification and Characterization of a Gene Encoding Phospholipase D Activity in Yeast. *J. Biol. Chem.* *271*, 2361–2364.
- Waksman, M., Tang, X., Eli, Y., Gerst, J.E., and Liscovitch, M. (1997). Identification of a Novel Ca²⁺-dependent, Phosphatidylethanolamine-hydrolyzing Phospholipase D in Yeast Bearing a Disruption in *PLD1*. *J. Biol. Chem.* *272*, 36–39.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F., and Wang, X. (2000). Involvement of Phospholipase D in Wound-Induced Accumulation of Jasmonic Acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* *12*, 2237–2246.
- Wang, X., Dyer, J.H., and Zheng, L. (1993). Purification And Immunological Analysis Of Phospholipase D from Castor Bean Endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* *302*, 486–494.
- Wang, X., Xu, L., and Zheng, L. (1994). Cloning and Expression of Phosphatidylcholine-hydrolyzing Phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* *269*, 20312–20317.
- Watanabe, T., Sato, H., Sagane, Y., Nakazawa, Y., and Takano, K. (1999). Primary structure of phospholipase D purified from cabbage leaves. *Jpn. J. Electroph.* *43*, 159–164.
- Weatherby, K., and Carter, D. (2013). *Chromera velia*. In *Advances in Applied Microbiology*, (Elsevier), pp. 119–144.
- Whitaker, B.D., Smith, D.L., and Green, K.C. (2001). Cloning, characterization and functional expression of a phospholipase D alpha cDNA from tomato fruit. *Physiol. Plant.* *112*, 87–94.
- Wilensky, R.L., Shi, Y., Iii, E.R.M., Hamamdzcic, D., Burgert, M.E., Li, J., Postle, A., Fenning, R.S., Bollinger, J.G., Hoffman, B.E., et al. (2008). Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A₂ reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat. Med.* *14*, 1059–1066.
- Wolf, G. (2009). Adipose-specific phospholipase as regulator of adiposity. *Nutr. Rev.* *67*, 551–554.
- Xie, Z., Ho, W.-T., and Exton, J.H. (1998). Association of N- and C-terminal Domains of Phospholipase D Is Required for Catalytic Activity. *J. Biol. Chem.* *273*, 34679–34682.

- Xu, Y., Seet, L.F., Hanson, B., and Hong, W. (2001). The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem J* 360, 513–530.
- Yang, D., and Li, W. (2016). Methanol-Promoted Lipid Remodelling during Cooling Sustains Cryopreservation Survival of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* 11, e0146255.
- Yang, H., and Roberts, M.F. (2003). Phosphohydrolase and transphosphatidylation reactions of two *Streptomyces* phospholipase D enzymes: Covalent versus noncovalent catalysis. *Protein Sci.* 12, 2087–2098.
- Yang, S.F., Freer, S., and Benson, A.A. (1967). Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 242, 477–484.
- Zambonelli, C., Casali, M., and Roberts, M.F. (2003). Mutagenesis of Putative Catalytic and Regulatory Residues of *Streptomyces chromofuscus* Phospholipase D Differentially Modifies Phosphatase and Phosphodiesterase Activities. *J. Biol. Chem.* 278, 52282–52289.
- Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y., and Oldenburg, K.R. (1999). A Simple Statistical Parameter For Use In Evaluation And Validation Of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen* 4, 67–73.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., and Wang, X. (2004). Phospholipase D 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9508–9513.
- Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., Wang, L., Welti, R., Zhang, W., and Wang, X. (2009). Phospholipase D 1 and Phosphatidic Acid Regulate NADPH Oxidase Activity and Production of Reactive Oxygen Species in ABA-Mediated Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 21, 2357–2377.
- Zhao, J., and Wang, X. (2004). *Arabidopsis* Phospholipase D α 1 Interacts with the Heterotrimeric G-protein α -Subunit through a Motif Analogous to the DRY Motif in G-protein-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 1794–1800.
- Zhao, Y., Du, J., Zhao, G., and Jiang, L. (2013). Activation of calcineurin is mainly responsible for the calcium sensitivity of gene deletion mutations in the genome of budding yeast. *Genomics* 101, 49–56.

Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M., and Wang, X. (2000). Distinct Ca^{2+} Binding Properties of Novel C2 Domains of Plant Phospholipase D α and β . *J. Biol. Chem.* 275, 19700–19706.

Zheng, L., Shan, J., Krishnamoorthi, R., and Wang, X. (2002). Activation of Plant Phospholipase D β by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate: Characterization of Binding Site and Mode of Action. *Biochemistry* 41, 4546–4553.

Zhou, M., and Panchuk-Voloshina, N. (1997). A One-Step Fluorometric Method for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity. *Anal. Biochem.* 253, 169–174.

Annexes

Tableau 7 : Séquences obtenues à l'issu du criblage des PLD α .

Nom de la séquence	Base de données	ID	Correction manuelle ou assemblage
Acer_saccharum	hardwoodgenomics.org	Acer_saccharum_022416_comp49626_c0_seq1_m_25214	
Aegilops_sharonensis	wheat-urgi.versailles.inra.fr	gn TSL_WGS_sharonensis_v1 TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_139175	x
Aegilops_speitoides	wheat-urgi.versailles.inra.fr	gn TGAC_WGS_speitoides_v1 TGAC_WGS_speitoides_v1_contig_201681	x
Aegilops_tauschii	aegilops.wheat.ucdavis.edu	tr N1QSW5 N1QSW5_AEGTAGN=F775_09720PE=3SV=1	
Amaranthus_hypochochondriacus	PhytosomeDB	AHYPO_005067-RA	
Amborella_trichopoda	NCBI	tr W1P7V6 W1P7V6_AMBTC_GN=AMTR_s00078p00051300	
Ammopiptanthus_nanus	NCBI	gi 924899158 gb ALC76805_1	
Anacardia_occidentale	PhytosomeDB	Anaoc.0007s0838.1	
Ananas_comosus	NCBI	tr A0A199V655 A0A199V655_ANACO	
Anthurium_amicola	Uniprot	tr A0A1D1YKT4 A0A1D1YKT4_9ARAE	
Apostasia_wallichii	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	AUTC018257	
Aquilegia_coerulea	PhytozomeDB	Aqcoe1G164800.1	
Arabidopsis_halleri	PhytozomeDB	Araha.3034s0021.1	
Arabidopsis_lyrata	NCBI	gi 297853014 ref XP_002894388_1	
Arabidopsis_thaliana			
Arabidopsis_alpina	NCBI	LT669790.1	Arabis
Arabidopsis_hypogaea	NCBI	gi 88193697 dbj BAE79735_1	Arabis_genome_assembly_chromosome_3
Arachis_duranensis	peanutbase.org	Aradu.FS7LG + Aradu.4Q29Q	x
Arachis_ipsaensis	peanutbase.org		
Araucaria_cunninghamii	Uniprot		
Artemisia_annua	plantGDB.org		
Arundo_donax	Uniprot		
Asparagus_officinalis	NCBI	XP_020251414_1	
Atropa_belladonna	medicinalplantgenomics.msu.edu	aba_locus_4868_iso=4_len=2815_ver=2	
Beta_vulgaris	NCBI	gi 731359185 ref XP_010691149_1	
Boechera_stricta	PhytozomeDB	Bostr.28625s0117.1	
Brachypodium_distachyon	NCBI	gi 357135516 ref XP_003569355_1	
Brachypodium_stacei	PhytozomeDB	Brast07G162600.1	
Brassica_junceae	Uniprot	gi 836600657 gb AKM76221_1	
Brassica_napus	NCBI	gi 511261437 gb AGN71005_1	
Brassica_oleracea	NCBI	gi 922494308 ref XP_013586008_1	
Brassica_rapa	NCBI	gi 685311256 ref XP_009146200_1	
Cajanus_cajan	legumeinfo.org/	C.cajan_00206	
Camelina_sativa	NCBI	gi 727632728 ref XP_010487412_1	
Campotheca_acuminata	medicinalplantgenomics.msu.edu	caa_locus_4215_iso_1_len_2810_ver_3	
Cannabis_sativa	genome.ccb.utoronto.ca/	C. sativa_Finola.14452338	
Capsella_rubella	NCBI	gi 565478726 ref XP_006297003_1	
Capsicum_annuum	peppersequencegenomics.cn	Capana03g000439[mRNA]locus=Chr03:6093052-6098122.+	
Carica_papaya	Uniprot	UniRef90_p86387_1_808_RepID=PLDA1_CARPA	

Castanea_mollissima	hardwoodgenomics.org	hardwoodgenomics.org	snap_masked-scaffold01907-abinit-gene-0.8-mRNA-1	Dichantherium_oligosanthos	Uniprot	tr A0A1E5VEW5 A0A1E5VEW5_9POAL	
Catharanthus_roseus	medicinalplantgenomics.msu.edu	medicinalplantgenomics.msu.edu	cra_locus_3139_iso_5_len_2876_ver_3	Digitalis_purpurea	medicinalplantgenomics.msu.edu	dpa_locus_4646_iso_1_len_2263_ver_4 dpa_locus_3734_iso_2_len_2263_ver_1	+ x
Cephalotus_follicularis	Uniprot	Uniprot	tr A0A1Q3D418 A0A1Q3D418_CEPFO	Dimocarpus_longan	NCBI	gi 325071291 gb ADY75750_1	
Chenopodium_quinoa	quinoa.kazusa.or.jp	quinoa.kazusa.or.jp	Cqu_c06370.1_g015.1 Cqu_c02403.1_g011.1	Dioscorea_villosa	medicinalplantgenomics.msu.edu	dva_locus_4199_iso_2_len_1330_ver_2 dva_locus_57205_iso_1_len_1294_ver_2	+ x
Choripora_bungeana	NCBI	NCBI	gi 544371640 gb AGW22212_1	Elaeis_guineensis	NCBI	gi 743875176 ref XP_010907270_1	
Cicer_arietinum	Legumeinfo.org	Legumeinfo.org	cicar.ICC4958.Ca_26353	Erycina_pusilla	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	EPTC011289	
Citrus_clementina	NCBI	NCBI	gi 567869291 ref XP_006427267_1	Erythranthe_guttata	Uniprot	gi 848918374 ref XP_012856438_1	
Citrus_sinensis	NCBI	NCBI	gi 572152911 ref NP_001275827_1	Eucalyptus_grandis	NCBI	gi 702380459 ref XP_010063458_1	
Citrullus_lanatus	icugi.org	icugi.org	Cla012712[mRNA]locus=Chr7:25591925:25595879+	Eutrema_salsugineum	NCBI	gi 567198686 ref XP_006406922_1	
Coccomyxa_subellipsoidea	This work	This work		Fagopyrum_esculentum	buckwheat.kazusa.or.jp	Fes_sc0000017.1.g000012.aua.1/f	
Cocos_nucifera	NCBI	NCBI	gi 599088676 gb AHN53202_1	Fagus_sylvatica	plantGDB.org	lcl PUT-181a-Fagus_sylvatica-13386	
Coffea_canephora	Uniprot	Uniprot	UniRef90_A0A068UQ75_1_807_RepID=A0A068UQ75_COFA	Fragaria_inumae	strawberry-garden.kazusa.or.jp	Fl_iscf00000135.1.g00001.1	
Corchorus_olitorius	Uniprot	Uniprot	tr A0A1R3JZ28 A0A1R3JZ28_9ROSI	Fragaria_nubicola	strawberry-garden.kazusa.or.jp	FNU_iscf00043984.1.g00001.1	
Craterostigma_plantagineum	NCBI	NCBI	gi 4867805 emb CAB43063_1	Fragaria_vesca_subsp_vesca	NCBI	gi 470134985 ref XP_004303313_1	
Cucumis_melo	NCBI	NCBI	gi 1035419752 ref XP_016902674_1	Fragaria_x_ananassa	Uniprot	gi 58891689 gb AAW83125_1	
Cucumis_sativus	NCBI	NCBI	gi 821595250 ref NP_001295822_1	Fraxinus_pennsylvanica	hardwoodgenomics.org	Fraxinus_pennsylvanica_120313_comp59847_c0_seq1_m.32547	
Cymbidium_ensifolium	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	CETC003830	Gastrodia_elata	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	GETC008602	
Cynara_cardunculus	Uniprot	Uniprot	gi 66346964 emb CAE47482_2	Genlisea_aurea	Uniprot	UniRef90_S8DR53_1_808_RepID=S8DR53_9LA	
Cypripedium_formosanum	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	CFTC026961	Ginkgo_biloba	medicinalplantgenomics.msu.edu	gba_locus_138_iso_5_len_3065_ver_2	x
Daucus_carota_subsp_sativus	Uniprot	Uniprot	gi 1040886372 ref XP_017252291_1	Gleditsia_triacanthos	hardwoodgenomics.org	Gleditsia_triacanthos_082614_comp26423_c0_seq1	
Dendrobium_catenatum	NCBI	NCBI	XP_020690475.1	Glycine_max	NCBI	gi 356519347 ref XP_003528334_1	
Dianthus_caryophyllus	carnation.kazusa.or.jp	carnation.kazusa.or.jp	Dca4072.1.3-exons f-1 sp Q9XFX8	Gossypium_arboreum	NCBI	gi 196166539 gb ACG70840_1	

Annexes

Gossypium_hirsutum	NCBI	gi 1031986117 ref NP_001314029_1	Marchantia_polymorpha	phytozomeDB	Mapoly0037s0125.1	
Gossypium_raimondii	NCBI	gi 823278207 ref NP_001296279_1	Medicago_truncatula	NCBI	gi 1922362120 ref XP_003604419_2	
Hevea_brasiliensis	RubberTreeGenome Search	isotig02286 + isotig04982	Mimulus_guttatus	phytozomeDB	Migut.D01066.1	
Hellianthus_annuus	NCBI	XP_021989082.1	Momordica_charantia	NCBI	XP_022146987.1	
Herrania_umbatica	NCBI	XP_021298177.1	Morus_notabilis	NCBI	gi 703101603 ref XP_010097235_1	
Hordeum_vulgare_subsp_p_vulgare	plantgdb.org	gi 151418359 gb AK249711.1	Musa_acuminata_subsp_malaccensis	NCBI	gi 695068352 ref XP_009381115_1	
Ipomoea_trifida	sweetpotato-garden.kazusa.or.jp	ltr_sc000547.1_g00011.1	Nelumbo_nucifera	NCBI	gi 719995169 ref XP_010254402_1	x
Ipomoea_nil	NCBI	XP_019179058_1	Neuwiedia_zollingeri	orchidstra2.abrc.sini ca.edu.tw	NZTC007677	
Jatropha_curcas	NCBI	gi 806776585 ref NP_001292934_1	Nicotiana_attenuata	NCBI	XP_019229753_1	
Juglans_regia	NCBI	XP_018851707_1	Nicotiana_benthhamiana	NCBI	gi 1926458000 dbj BAS29955_1	
Kalanchoe_fedtschenkoi	PhytosomeDB	Kaladp0037s0351.1	Nicotiana_sylvestris	NCBI	gi 698509392 ref XP_009799916_1	
Kalanchoe_laxiflora	PhytozomeDB	Kalax.0860s0008.1	Nicotiana_tabacum	NCBI	gi 1027859736 ref NP_001312217_1	x
Lactuca_sativa_Letassy	plantGDB.org	gi 329673138 gb J1575644.1	Nicotiana_tomentosifor mis	NCBI	gi 697143152 ref XP_009625689_1	
Lactuca_serriola_Serrass y	plantGDB.org	gi 340631698 gb J0022425.1	Noctcaea_caerulescens	Uniprot	tr A0A1J3CX52 A0A1J3CX52_NOCCA	
Leersia_perrieri	Uniprot	UniRef90_A0A0D9WDB2_1_821_RepID=A0A0D9WDB2_9ORYZ	Nyssa_sylvatica	hardwoodgenomics. org	Nyssa_sylvatica_10132014_comp26876_c0_se q2_m.12186	
Lindenbergia_philippensis	ppgp.huck.psu.edu/	LipGnB1_18378	Ophrys_sphogodes	orchidstra2.abrc.sini ca.edu.tw	OSTC013733	
Linum_usitatissimum	PhytosomeDB	Lus10041787	Orchis_italica	orchidstra2.abrc.sini ca.edu.tw	OITC005672	
Liquidambar_styraciflua	hardwoodgenomics. org	Liquidambar_styraciflua_01052015_comp409 85_c0_seq1_m.23207	Orobanche_aegyptiaca	ppgp.huck.psu.edu/	OrAe0GB1_43359	
Liriodendron_tulipifera	hardwoodgenomics. org	Liriodendron_tulipifera_10132014_comp2547 8_c0_seq1_m.35846	Oropetium_thomaeum	PhytozomeDB	Oropetium_20150105_07247A	
Litchi_chinensis	NCBI	gi 310780853 gb ADP23922_1	Oryza_barthii	gramene.org	tr A0A0D3EK51 A0A0D3EK51_9ORYZ	
Lolium_temulentum	NCBI	gi 237637581 gb ABX83202_2	Oryza_brachyantha	NCBI	gi 573912199 ref XP_006643814_1	
Lotus_japonica	kazusa.or.jp/lotus/	LJ03v0116389.1	Oryza_glaberrima	gramene.org	tr 11NKP2 11NKP2_ORYGL	
Lupinus_angustifolius	NCBI	tr A0A1J7G7Y5 A0A1J7G7Y5_LUPAN	Oryza_glumipatula	Uniprot	tr A0A0D9Y3X6 A0A0D9Y3X6_9ORYZ	x
Malus_domestica	NCBI	gi 658049276 ref XP_008360327_1	Oryza_meridionalis	gramene.org	tr A0A0E0DMQ1 A0A0E0DMQ1_9ORYZPE=3S V=1	
Manihot_esculenta	PhytozomeDB	Manes.04G113900.1	Oryza_nivara	gramene.org	tr A0A0E0FGW9 A0A0E0FGW9_ORYNIPE=3S V=1	

Oryza_punctata	plants.ensembl.org	1dna:chromosomeAVCL000000000:1:3170000:3180000:1:	x	Populus_deltoides	PhytosomeDB	PodeI.03G040800.1
Oryza_rufipogon	gramene.org	tr AA0A0E0MS02 AA0A0E0MS02_ORYRPUPE=3SV=1		Populus_euphratica	NCBI	gi 743928492 ref XP_011008453_1
Oryza_sativa_Japonica_Group	NCBI	gi 10022229990 ref XP_015646609_1		Populus_trichocarpa	NCBI	gi 566160536 ref XP_006385316_1
Panax_quinquefolius	medicinalplantgenomics.msu.edu	pqa_locus_2945_iso_5_len_2963_ver_2		Prunus_avium	NCBI	XP_021806419.1
Panicum_hallii	PhytozomeDB	Pahal.E04146.1		Prunus_mume	NCBI	gi 645277360 ref XP_008243733_1
Panicum_virgatum	PhytozomeDB	Pavir.J37463.1		Prunus_persica	NCBI	gi 595963988 ref XP_007217042_1
Papaver_somniferum	Uniprot	UniRef90_Q8W1B2_1_813_ReplD=Q8W1B2_P_APSO		Pyrus_x_bretschneideri	NCBI	gi 694443469 ref XP_009348321_1
Petunia_infiata	solgenomics.net	Peinf1015cf01889g07027.1		Quercus_rubra	hardwoodgenomics.org	Quercus_rubra_120313_comp31539_cd_seq2_m_33063
Petunia_axillaris	solgenomics.net	Peaxi1625cf00207g00635.1		Quercus_rubra		
Phalaenopsis_aphrodite	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	PATC152710		Raphanus_sativus	radish.kazusa.or.jp	Rsa1.0_01316.1_g00008.1
Phalaenopsis_bellina	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	PBTC021795		Rauwolfia_serpentina	medicinalplantgenomics.msu.edu	rsa_locus_2363_iso_8_len_2796_ver_2
Phalaenopsis_equestris	NCBI	XP_020572452.1		Rhinolophus_sinicus	NCBI	XP_019575908.1
Phalaenopsis_lueddemanniana	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	PLTC002313		Ricinus Communis	NCBI	gi 1021312158 ref NP_001310687_1
Phalaenopsis_modesta	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	PMTC011286		Rosmarinus_officinalis	medicinalplantgenomics.msu.edu	roa_locus_19353_iso_7_len_2904_ver_2
Phalaenopsis_schilleriana	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	PSTC003310		Salix_purpurea	PhytozomeDB	SapurV1A.1759s0050.1
Phaseolus_angularis	Uniprot	tr AA0A0L9T9K9 AA0A0L9T9K9_PHAANGN=LR48_Vigan406s011000PE=3SV=1		Selaginella_moellendorffii	Uniprot	UniRef90_D8R9X4_1_810_ReplD=D8R9X4_SELML
Phaseolus_vulgaris	NCBI	gi 593267134 ref XP_007135745_1		Sesamum_indicum	NCBI	gi 747054459 ref XP_011073437_1
Phoenix_dactylifera	NCBI	gi 672136660 ref XP_008792037_1		Setaria_italica	NCBI	gi 526117421 ref NP_001267764_1
Physcomitrella_patens	NCBI	gi 168020824 ref XP_001762942_1		Setaria_viridis	PhytozomeDB	SeVir.9G383500.1
Picea_sitchensis	congenie.org	lc PUT-183a-Picea_sitchensis-25803 + 14430 + 23691	x	Silene_vulgaris	silengenomics.bio.virginia.edu	lc isotig30216gene=isogroup10418length=2559numContigs=1
Pimpinella_brachycarpa	NCBI	cdNA U96438.1	x	Solanum_lycopersicum	NCBI	gi 13111655 gb AAG45485_1
Pinus_taeda	congenie.org	lc scaffold11357.1	x	Solanum_melongena	eggplant.kazusa.or.jp	Sme2_5_00018_1_g00030_1
				Solanum_pennellii	NCBI	gi 970035852 ref XP_015079263_1
				Solanum_peruvianum	solgenomics.net	a10339
				Solanum_pimpinellifolium	solgenomics.net	Sopim06g068090
				Solanum_tuberosum	NCBI	gi 565379597 ref XP_006356207_1

Sorghum_bicolor	NCBI	gi 242086400 ref XP_002443625_1	Wollemia_nobilis	Uniprot	UniRef90_A0A0C9RUJ2_1_812_ReplID=A0A0C9RUJ2_9SPER
Sphagnum_fallax	PhytozomeDB	SphiFax0019s0052.1	Zea_mays	NCBI	gi 670428155 ref XP_008654846_1
Spinacia_oleracea	genomevolution.org	Sp_062600_owsz.t1	Ziziphus_jujuba	NCBI	gi 1009112854 ref XP_015870462_1
Spirodela_polyrhiza	PhytozomeDB	Spipo0G0089800	Zostera_marina	PhytozomeDB	Zosma4g01770.1
Striga_hermanthica	ppgp.huck.psu.edu/	STHe61FB1_1094	Zoysia_japonica_nagirizaki	zoysia.kazusa.or.jp	Zjn_sc00011.1.g05600.1.sm.mkhc 2711587..2715900 -
Tarenaya_hassleriana	NCBI	gi 729360056 ref XP_010545768_1	Zoysia_matrella_wakaba	zoysia.kazusa.or.jp	Zmw_sc00159..g00070.1.sm.mkhc 14962..19209 -
Theobroma_cacao	NCBI	gi 590615267 ref XP_007023175_1	Zoysia_pacifica_zanpa	zoysia.kazusa.or.jp	Zpz_sc00039.1.g00690.1.sm.mkhc 322287..326530 +
Trifolium_pratense	PhytozomeDB	Tp57577_TGAC_v2_mRNA39968			
trifolium_subterraneum	clovergarden.jp	Tsud_chr6.g02240.1.am.mkhc 1631588..1635259-			
Triphysaria_pusilla	ppgp.huck.psu.edu/	TrPuRnBC1_17902+16471+14731+4777			
Triphysaria_versicolor	ppgp.huck.psu.edu/	TrVeBC1_252			
Triticum_aestivum	plantgdb.org	gi 32128813 gb BT009262.1			
Triticum_durum	wheat-urgi.versailles.inra.fr	gnl TGAC_WGS_durum_v1 TGAC_WGS_durum_v1_contig_2585141			x
Triticum_monococcum	wheat-urgi.versailles.inra.fr	gnl TGAC_WGS_monococcum_v1 TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_915199			x
Triticum_turgidum	wheat.pw.usda.gov	UCW_Tt-k41_contig_5877predictedORF(type 'full_length')based_on_protein_gnl BL_ORD_D 4120' from_relative_'bd';_masked_based_on_gnl TREP TREP1650			
Triticum_urartu	wheat.pw.usda.gov	UCW_Tu-k35_contig_15predictedORF(type 'full_length')based_on_protein_gnl BL_ORD_D 9175' from_relative_'bd'			
Valeriana_officinalis	medicinalplantgenomics.msu.edu	voa_locus_7531_iso_8_len_1120_ver_2 + voa_locus_7973_iso_2_len_2473_ver_2 + voa_locus_7984_iso_1_len_713_ver_2			x
Vanilla_planifolia	orchidstra2.abrc.sini.ca.edu.tw	VPTC011653			
Vigna_angularis	NCBI	tr A0A0S3T0K0 A0A0S3T0K0_PHAANGN=Vignan_09G223400PE=35V=1			
Vigna_radiata_var._radiata	NCBI	gi 951035742 ref XP_014516428_1			
Vigna_unguiculata	NCBI	gi 1928979 gb AAB51392_1			
Vitis_vinifera	NCBI	gi 951311832 gb ALN66065_1			

Article 1

Arhab Y., Abousalham A. and Noiriél A. (2018).

Plant Phospholipase D mining unravels new conserved residues important for catalytic activity

Article soumis à BBA Molecular and Cell Biology of lipids

Plant Phospholipase D mining unravels new conserved residues important for catalytic activity

Running title: Plant phospholipase D mining unravels new important residues

Yani Arhab[‡], *Abdelkarim Abousalham*[‡], and *Alexandre Noiriel*^{‡*}

[‡] Univ Lyon, Université Lyon 1, Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS), UMR 5246 CNRS, Métabolisme, Enzymes et Mécanismes Moléculaires (MEM²), Bât Raulin, 43 Bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France.

* To whom correspondence should be addressed : Alexandre Noiriel, Université Lyon 1, Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS), UMR 5246 CNRS, Métabolisme, Enzymes et Mécanismes Moléculaires (MEM²), Bât Raulin, 43 Bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France.

Alexandre.Noiriel@univ-lyon1.fr

Tel (+33) 427 465 731

Keywords

Arabidopsis thaliana, C2 domain, HKD motif, Phospholipase D, post-translational modification, transphosphatidylation.

Abstract

Phospholipase D (PLD) is a key enzyme involved in several processes in all living organisms. Hydrolysis of phospholipids by PLD allows the release of phosphatidic acid which is a crucial intermediate of multiple pathways and signaling reactions, including tumorigenesis in mammals and defense response in plants. One of a common feature shared by the plant alpha isoform (PLD α) with some PLD from microbes and with all PLD from eukaryotes is a duplicated motif named HKD involved in the catalysis. However, other residues are strictly conserved among these organisms but their role remains obscure. In order to gain further insight into PLD structure and role of these conserved residues, we looked for all plant PLD α sequences available in public databases. With more than 200 sequences retrieved, a generic sequence was constructed showing that 138 residues are strictly conserved among plant PLD α , with some of them identical to residues found in mammalian PLDs. Using site-directed mutagenesis of the PLD α from *Arabidopsis thaliana*, we demonstrated that mutation of some of these residues abolished the PLD activity. Moreover, mutation of residues around both HKD motifs enabled to re-define a consensus sequence of these motifs. By sequential deletions of the N-terminal extremity, the minimum length of the domain required for catalytic activity was identified. Taking together, this work is a new step to better understand the structure of eukaryotic PLDs and may lead to the discovery of new regions involved in catalytic reaction that could be targeted by small molecule modulators of PLDs.

Introduction

Phospholipase D (PLD) superfamily is a diverse group of enzymes found in microbes, fungi, viruses, plants and animals (1). Members of the PLD superfamily include several classes of enzymes that have in common to act on phosphodiester bound, as classical PLDs (EC 3.1.4.4) catalyzing the hydrolysis of the distal phosphoester bound of phospholipids, or cardiolipin synthases and phosphatidylserine synthases that both catalyze a phosphatidyl transfer reaction, and along with some bacterial nucleases as Nuc that catalyzes the hydrolysis of DNA phosphodiester bounds (2).

In plants, where PLD activity was first discovered (3), several types of PLDs are present, but the alpha isoform (PLD α) is largely widespread, and different PLD isoforms are entailed in stress physiology and signal transduction *via* hydrolysis of phospholipids. More generally, PLDs are involved in a broad range of cellular and physiological processes (2) and particularly in numerous pathological disorders in mammals (4–6). As an example, phosphatidic acid (PA) which is a product of the PLD-catalyzed hydrolysis of various phospholipids, is able to recruit and regulate numerous membrane-associated proteins, such as the mammalian target of rapamycin (mTOR) or the proto-oncogenic serine/threonine kinase Raf-1 making PLD an important therapeutic target (5–9).

On top of its hydrolytic reaction, PLDs are able to catalyze as well a transphosphatidylation reaction between a phospholipid and a primary alcohol that permits the exchange of the polar head of phospholipids and consequently contributing to the diversity of phospholipids (2).

PLD enzymes could be divided into two distinct groups based on their primary structure: the HKD group and the non-HKD one (2). The HKD group which is a member of the PLD superfamily is characterized by the presence of the consensus sequence, HXKX₄D, also called HKD motif, where X denotes any kind of residues. This motif is reported to be mostly found in mammals with the PLD1 and PLD2 isoforms in *Homo sapiens*, in plants with the predominant PLD α isoform, in yeast with SPO14 (10), and in some microbes with the crystallized PLD from *Streptomyces sp.* strain PMF (11). The non-HKD PLD group is made up of other well-studied enzymes as the PLDs from *Streptomyces chromofuscus* (12) or from the spider *Loxosceles* (13) that belong to the superfamily of PLC-like phosphodiesterase (14).

The hallmark of the HKD PLD group is the presence of a conserved His, Lys and Asp in a typical HXKX₄D sequence. This consensus sequence is unique in the Nuc primary structure, but the protein forms a homodimer in its catalytically competent form, and the two motifs form a single functional catalytic site (15). In plants, mammals and in some bacteria, the HKD motif is duplicated in the primary structure, and both motifs are thought to be close together in the tertiary structure and form the catalytic site at the interface of the bi-lobed enzyme (1).

In plants, as in the model plant *A. thaliana*, multiple PLD genes encoding isoforms are grouped into six classes : α , β , γ , δ , ϵ and ζ , based on the gene architectures, sequence similarities, domain structures, and biochemical properties (16–18). The conventional PLD α , in contrast to other PLD isoforms, is phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂)-independent and requires millimolar levels of Ca²⁺ for *in vitro* activity at physiological pH (19, 20). Nevertheless, using the recombinant PLD α from *Ricinus communis*, it was demonstrated that at an acidic pH and in the absence of Ca²⁺, PLD α have a basal hydrolytic activity towards phosphatidylcholine (PC) vesicles containing both phosphatidylethanolamine and PIP₂, and were stimulated by Ca²⁺ concentrations ranging from 10 to 500 μ M (20).

The PLD α isoforms bear at the N-terminal extremity a C2 domain of around 150 residues that are involved in the Ca²⁺-dependent membrane binding and adsorption of the enzyme (16, 21, 22). It

was recently shown by our group that the *Arabidopsis* PLD α C2 domain binds phosphatidylglycerol in a Ca²⁺-independent manner while PA and phosphatidylserine bindings were found to be enhanced in the presence of Ca²⁺ (21). However, because the mature PLD α is cleaved at its N-terminal extremity, it is not yet clear which residues of this C2 domain are necessary for the Ca²⁺-dependent membrane binding. Indeed, this region undergoes a post-translational modification (PTM) described as a cleavage of thirty to forty residues at the N-terminal C2 domain extremity. This PTM is found in two cases : either when the PLD α is purified directly from plant tissues as *Brassica oleracea* (23), *Ricinus communis* (24), *Oriza sativa* (25), and *Glycine max* (26), or when the protein is purified in a recombinant way such as *Vigna unguiculata* PLD α expressed in insect cells (27) or in *P. pastoris* (28), or as the *A. thaliana* PLD α expressed in *P. pastoris* (21), the exception being the PLD from *Brassica oleracea* (29) expressed in *E. coli*, where the absence of the PTM seems not to impair the catalytic activity. Consequently, the importance and the need of the N-terminal extremity tend to be questioned and need further investigation.

Plant PLD α has been a conventional model for PLD research. Recombinant plant PLD α is easy to produce in high amounts in insect cells (27) or in the yeast *P. pastoris* (28), and this enzyme requires only Ca²⁺ as a cofactor, compared to other plant isoforms and to mammalian PLDs that require numerous cofactors such as G proteins, PIP₂, fatty acids and so on (2). Moreover, the level of plant PLD α activity is higher and could be measured easily in a direct and continuous way using the assay based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline following Ca²⁺-complexation with PLD-generated PA (30), contrary to mammalian PLDs that have to be assayed discontinuously using radiolabeled substrates in end-point kinetics. All these reasons made plant PLD α valuable tools to study structural and functional properties of eukaryotic PLDs. The importance of the invariant charged motif HXKX₄D was first reported and defined in 1995 (31). Mechanistically, eukaryotic PLDs are thought to follow a two-step ping-pong reaction mechanism between the two HKD domains that necessitate both to be present (32) and intact to allow a biochemical reaction, meaning that the duplicated motifs do not function independently, as it was demonstrated for the human PLD1 (33), and signifying that a single mutation in these motifs abolishes the catalytic activity (33). In 1999, the tridimensional (3D) structure of the endonuclease Nuc from *Salmonella typhimurium*, a prokaryotic PLD family member which bears only one HKD motif, was solved (15). The Nuc enzyme crystallizes as a dimer in which the two HKD motifs come together to form a functional catalytic site at the interface of the subunits, and the consensus sequence of the HKD motif was refined as HXKX₄DX₆G SXN (15). The structural position of the two HKD domains was further confirmed in the crystallized form of the monomeric bacterial PLD from *Streptomyces sp.* strain PMF (11). Because the HKD motif has only been described in the extended version HXKX₄DX₆G SXN, which does not differentiate the first motif from the second one, also because this version relies on sequence alignment exclusively, here we propose a reevaluation of each one of both HKD motifs based on biochemical enzymatic evidences.

The importance of a few residues of PLD family members has already been checked, as an example in Ymt, the *Yersinia pestis* murine toxin (34) where the H, K, and S residues of both motifs were mutated. In plants, as far as the PLD α isoform is concerned, only a few conserved domains have been identified so far. Mutations of the EFK motif, analogous of the DRY motif, have shown that this motif allows the interaction of the G α subunit of the G-protein with the PLD α isoform (35, 36).

The N-terminus extremity of human PLDs which is not conserved among mammalian PLDs was shown not to be critical. Expression of mutants lacking the first 325 residues of PLD1 (37) or the first 308 residues of PLD2 (38) were still catalytically active. However, the importance of the C-terminal extremity was proven to be crucial: mutation of the C-terminal threonine of PLD2 by an alanine conferred essentially wild-type PLD activity but addition of a single residue dramatically alters the catalytic activity (38), and when the carboxyl terminus of PLD1 is deleted, the enzyme was found to be inactive (37). Addition of an hexahistidine tag at the C-terminal extremity of PLD1 led to the complete attenuation of the activity (39). In cabbage, it is postulated that the C-terminus contributes as well to the functional conformation of active PLD α when expressed in *E. coli* (40), this latter study analyzed besides the involvement of some conserved residues in the hydrolytic and the transphosphatidylation reactions.

PLD being nowadays an important target in human health (41) especially for cancer treatment (42), and because plant and mammalian PLDs share unique and common features, we used in this study the PLD α , the major isoform found in plant and investigated the importance of the conserved residues in order to better understand their involvement in the PLD catalysis.

Material and Methods

Material

Zeocin was obtained from InvivoGen (Toulouse, France), Zymolyase and Ampicillin were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). *P. pastoris* X-33 strain was from Invitrogen. 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*, horseradish peroxidase (type VI), bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin-Fallavier, France). All other chemicals and solvents of highest quality were obtained from local suppliers.

Pichia pastoris transformation

An isolated clone of *P. pastoris* was cultured overnight in 50 mL Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium at 30°C and the OD was then measured. Cells were harvested by centrifugation 5 min at 1,500 x g and then washed twice with 40 mL of sterile water and twice with 20 mL 1 M sorbitol at room temperature. Cells were finally resuspended in a volume of 1 M sorbitol with an OD equivalent to 75.

Competent cells were transformed with 0.4 – 2.0 µg of AvrII linearized plasmid purified using the Qiaquick kit from Qiagen. Briefly, 80 µL of cells were mixed with DNA in an electroporation cuve which underwent an electric shock of 2 kV during 6 ms. Cells were then resuspended in 1 mL of 1 M sorbitol and incubated 90 min at 30°C, then plated onto solid YPD with Zeocin at 0.1 mg/mL. After 2 days of incubation at 30°C, clones were then restreaked onto YPD medium containing Zeocin at 0.2 mg/mL.

Protein expression

Each mutant and appropriate controls were cultured for 48 h at 30°C, under orbital shaking (180 rpm), in 4 mL of YPD medium supplemented with 0.1 mg/mL Zeocin. The cells were then harvested by centrifugation and lysed using either a Mini Beadbeater or a FastPrep-24™ 5G Instrument (Biospec), 5 times 30 s and conserved on ice in between, with 1 mL of glass beads (425 - 600 µm diameter) in lysis buffer composed of Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 150 mM and sucrose 200 mM. The soluble fraction was obtained after 10 min of centrifugation at 9,500 x g at 4°C. The protein concentrations were measured using Bradford's method (43) with Bio-Rad Dye Reagent and BSA as the standard.

PLD activity measurement

PLD activity was assayed according to (44). Briefly, the protein extract to be tested was added to the assay mixture (100 µL final volume) composed of 0.4 mM DMPC, 1.24 mM SDS, 1.24 mM Triton X-100, Tris-HCl 50 mM with 20 mM CaCl₂ pH 8.0, and incubated for 10 minutes at 30°C. The reaction was stopped by adding 25 µL of 500 mM EDTA pH 8.0 and then the PLD activity was revealed by adding 25 µL of chromogenic mixture composed of 280 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 U choline oxidase, 0.5 U peroxidase, 10 mM 4-aminoantipyrine and 54 mM sodium 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzene sulfonate. The PLD-generated choline was quantified by end point measurement 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.

Alternatively, PLD activity was assayed with 8-hydroxyquinoline as described previously (30).

Immunoblotting analysis

Crude protein extracts (10 µg) were separated by using SDS-PAGE on 10% gels as described by Laemmli (45). Proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes for 90 min at 250 mA in a transfer buffer composed of 25 mM Tris, 200 mM glycine, and 20% (v/v) ethanol, using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). Nonspecific protein binding sites were blocked by incubating membranes for 1 h in a blocking solution containing 5% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Tween 20 in Tris Buffer Saline (TBS). Membranes were then incubated overnight at 4°C with polyclonal antibodies (serum at a dilution 1: 4,000) raised in rabbit against a peptide corresponding to the last 117 residues of the *A. thaliana* PLD α C2 domain (21) in TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 1% (w/v) BSA. Unbound primary antibodies were removed by four washes (5 min each) with TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (TBS-T). The membranes were incubated with peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) (diluted 1: 10,000 with TBS-T) for 1 h followed by four washes (5 min each) with TBS-T and revealed with enhanced chemiluminescence Western blotting solutions (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

Monoclonal anti-polyhistidine-peroxydase antibody (reference A7058-1VL, Sigma-Aldrich) produced in mouse was incubated overnight at 4°C (dilution 1: 2,000). Unbound antibodies were removed by four washes (5 min each) with TBS-T and revealed with enhanced chemiluminescence Western blotting solutions (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

Data mining

To gather a maximum of PLD α sequences we used as a seed the *A. thaliana* PLD α sequence (U36381) (46) which harbors the following natural variations R26M, A218T, L323S, I498T, and E580G compared to AT1G52570. We proceeded to a tBLASTn on the NCBI database with default parameters to acquire a first set of sequences. Then we proceeded to a BLASTp using the keyword "PLD" on the Phytozome v12.1 database. Using these sequences, we implemented following criteria i, ii, and iii to screen all the remaining plant alpha-type PLD (Table S1) from 31 different databases whereas they were properly annotated or not. (i) The nucleotide sequences should be complete from the starting methionine to the stop codon, and the length should be comprised in a range from 800 to 840 residues, all partial fragments were excluded explaining the absence of some organisms such as *Secale cereale*. (ii) The sequences should contain all the following markers from the N-terminus to the C-terminus that were found in published PLD α : (a) directly downstream of the starting methionine a consensus sequence HGX₅I, (b) a sequence (I/V)(Y/C)(I/V)XGWS(V/I) between the 220th and 240th residues, (c) then a conserved (M/V)XT(H/G)D sequence, (d) a first HKD catalytic motif HXXK₄D, (e) a conserved motif (F/Y)(I/V)Y(I/V)ENQYF(L/I)GX₄W around the 520th residues with a typical (Y/F)(I/V)XAIRXA motif upstream, (f) then the second HKD motif HXXK₄D, (g) finally a consensus sequence PX₂(L/I)T(T/S). (iii) The sequences should have been correctly spliced. Consequently, twenty-five sequences have been manually corrected because some introns were identified and not correctly *in silico* spliced. Typically, for *Aegilops sharonensis* and *A. speltoides*, as for *Triticum durum* and *T. monococcum*, *Cannabis sativa*, *Dianthus caryophyllus*, *Oryza punctata* and *Pinus taeda* the same introns have been manually spliced both in the N-terminus region and downstream of the second HKD motif. For *Aquilegia coerulea*, *Citrullus lanatus* and *Ipomoea trifida*, an intron has been manually spliced at the N-terminus extremity. Fragments of sequences have been assembled to build the *Arabis alpina*, *Digitalis purpurea*, *Dioscorea villosa*, *Hevea brasiliensis*, *Picea sitchensis* and *Valeriana officinalis* PLD α sequences. For *Arachis duranensis*, a missing fragment at the N-terminus extremity was added from another coding DNA sequence (CDS). There was a

wrong splicing in the *Pimpinella brachycarpa* sequence, an intron was found to replace the missing (F/Y)(I/V)Y(I/V)ENQYF(L/I)G_{x4}W consensus motif, this has been corrected with the right exon. Because there were some X in the sequences of *Chenopodium quinoa*, *Gincko biloba*, *Nelumbo nucifera* and *Nicotiana tabacum*, we replaced those by the corresponding residues found in the corresponding genomic sequence. Also, the sequences of *Oryza glumipatula* and *Quercus rubra* that did not start at the usual methionine were manually corrected by removing the peptide that did not fit the alignment.

In the case where several sequences were identified in single organism, which would correspond to multiple α isoforms, we deliberately selected the closest isoform, in term of sequence identity, to our PLD α model from *A. thaliana*. This has been done to keep purposely only one PLD per organism and not to influence the consensus sequence.

It should be stated that a similar PLD α sequence has been found in the bat *Rhinolophus sinicus* recently sequenced (47). First this sequence is strikingly similar with plant PLD α , secondly bats and particularly *Rhinolophus sinicus* exhibit in genomic databases typical PLDs found in mammals, and finally such a plant-like sequence cannot be found in complete sequenced genomes from other bats or mammals, we consequently presume that this sequence is due to a biological contamination during the sequencing. However, because this sequence brought more diversity in the sampling of PLD α , we kept it in our set even if its origin is doubtful.

Cloning of the PLD α from *Coccomyxa subellipsoidea* C-169.

This unicellular green alga (48) was obtained from the Van Etten laboratory (University of Nebraska-Lincoln, USA). Cultures were shaken at 60 rpm for 14 days at 20°C, and grown on Modified Bold's basal Medium (MBBM) containing 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of tetracycline under a cycle of 10 h of light and 14 h of dark in a New Brunswick Scientific Innova 4340 incubator.

Total mRNAs were extracted using the kit "RNA isolation from plant" from Macherey-Nagel. One μg of RNA was then retrotranscribed using either random hexamers or a polyT primer, and SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were performed using a subset of primers designed based on the genomic sequence (48). Several PCR fragments were obtained, cloned into the pGEM-T Easy vector and sequenced (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). Three fragments called A, B and C covering the whole sequence were further used. First, the fragment A was amplified by PCR using flanking primers bearing *EcoRI* and *NheI* restriction site respectively at the 5' and 3' end. Secondly, fragments B and C were then fused by Splicing by Overlap Extension (SOEing), to get the fragment B-C that was further amplified using flanking primers harboring *NheI* and *NotI* restriction sites respectively at the 5' and 3' end. The fragments A and B-C were then digested by *EcoRI*, *NheI* and *NotI*, and sequentially ligated together into the yeast expression vector pGAPZB to build the full length cDNA of 2460 bp encoding the PLD α of this green alga. The sequence was deposited in Genbank under the reference MG807645.

Cloning of the different constructions of PLD α from *Arabidopsis thaliana*.

The 6-His tagged version of AtPLD α was constructed by PCR using the forward primer 222 encoding the 6-His tag and the reverse primer 97 (see Table S2 for primers sequences). The PCR product was then digested and cloned into the *SacII* and *NotI* restriction sites of the pGAPZB plasmid. This construction harbors at the 5' extremity a *NdeI* restriction site CATATG formed by the last codon CAT of the tag and the first ATG of the coding PLD. The double mutant A35H-

N36M of the 6-His tagged version harbors a second *NdeI* restriction site CATATG where the two mutations take place. Therefore, we digested this construction using *NdeI* to remove the 36-residue long propeptide and ligated back together the remaining extremities to build the $\Delta 36$ truncated 6-His tagged version of AtPLD α .

Mutagenesis

AtPLD mutations were generated using the GeneArt® Site-Directed Mutagenesis PLUS system from Invitrogen with cDNA cloned into the pGAPZB as template (21). Primers listed in Table 1 were used to mostly substitute each targeted residue by an alanyl residue. The *A. thaliana* PLD α cDNA (U36381) was a gift from Dr. Wang (Donald Danforth Plant Science Center, St Louis, Missouri, USA) and used as the template to mutate the wild-type version of the protein; the 6 His-tagged version of AtPLD α was used to mutate the N-terminal propeptide.

Random mutations isolation

Several runs of site-directed mutagenesis led to the obtaining of random point-mutations, that were further isolated from designed point-mutation. Mutation P208S initially fused with H661A was isolated using the two *MfeI* restriction sites both located in the promotor and in the *AtPLD* gene at the nucleotide position 1394. The *MfeI-MfeI* fragment of 1410 bp bearing the P208S mutation was then transferred into the wild-type construction digested by *MfeI* and dephosphorylated. The same operation has been conducted to isolate the mutation A289V fused with Y659A. The correct orientation of the fragments was verified by PCR with appropriate primers, and the whole constructions were then sequenced to ensure the authenticity of the construct. Single mutations H661A and Y659A have been obtained during other runs of site-directed mutagenesis.

The mutation A85S fused with H332A has been isolated using the two *HindIII* restriction sites located at positions 434 and 2206 of *AtPLD*. The *HindIII-HindIII* fragment of 1772 bp bearing the mutation H332A was then transferred into the wild-type construct digested by the same enzyme and dephosphorylated. The *HindIII-HindIII* wild-type fragment was also transferred back into the construct containing the random mutation A85S. The same exchange has been conducted to isolate the mutation R65G fused with S348A.

Finally, the separation of P415T from the A35L mutation was done using the *XhoI-NotI* fragments of 1708 bp to take out P415T and transferred it into the wild-type construct digested under the same conditions. The A35L mutation was isolated using *XhoI-XhoI* fragment of 763 bp and transferred into the 6-His tagged version of AtPLD.

Cloning of AtPLD minimal domain

Deleted versions of AtPLD named $\Delta 70$ and $\Delta 164$ were synthesized using primers that restrict the length by 210 or 492 nucleotides respectively and were amplified using forward primers 244 and 246 respectively and the reverse primer 97 (the primers are listed in the Table S2) using the Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). For the constructions N Δ 82, N Δ 93, N Δ 106, N Δ 119 and N Δ 141, *AtPLD α* was amplified using primers that restrict the length by 246, 279, 318, 357 and 423 nucleotides respectively using forward primers 405, 406, 407, 408 and 409 respectively and the reverse primer 97 using the Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). All constructs harbor a *SacII* restriction site at the 5' end and a *NotI* restriction site at the 3' end. PCR products were purified using the Qiaquick PCR Purification Kit, and then incubated with the Taq DNA polymerase (Euromedex) and dNTP to build an A-tail at both extremities. Products were then ligated into the pGEM®-T Easy vector (Promega), transformed

and selected into JM109 *E. coli* competent cells according to the manufacturer protocol. To obtain deleted versions of AtPLD named $\Delta 0$, $\Delta 35$, $\Delta 50$, $\Delta 152$, a small fragment of the 5' part of the gene was amplified using the Taq DNA polymerase (Euromedex) using forward primers 241, 242, 243, 245 respectively and the reverse primer 102 for $\Delta 0$, $\Delta 35$, $\Delta 50$ and primer 387 for $\Delta 152$. PCR products were ligated into the pGEM®-T Easy vector as previously described.

For the constructions $\Delta 0$, $\Delta 35$, $\Delta 50$, the plasmid was then transformed into the *dam-3 E. coli* strain GM48 to avoid plasmid methylation of *BclI* sites and purified. Then, using *SacII* and *BclI* restriction sites the 5' extremity of the $\Delta 70$ minimal domain cloned into the pGEM®-T Easy vector was alternatively replaced by the *SacII/BclI* insert of the constructions $\Delta 0$, $\Delta 35$ and $\Delta 50$. For the construction of AtPLD $\Delta 152$, using *SacII* and *XhoI* restriction sites, the 5' extremity of the $\Delta 164$ minimal domain cloned into the pGEM®-T Easy vector was replaced by the *SacII/XhoI* insert of the construction $\Delta 152$.

Finally, all constructions were sequenced using the T7 promoter and SP6 promoter primers found in the pGEM®-T Easy vector before being transferred into the pGAPZB *P. pastoris* expression vector using *SacII* and *NotI* restrictions sites. The final PLD constructions were entirely sequence-verified using primers located on the *pGAP* promoter, *pGAP* terminator and on the *AtPLD* sequence.

Protein purification

Proteins were extracted in a phosphate buffer containing 50 mM NaH₂PO₄ and 300 mM NaCl pH 8.0. First, the Protino® Ni-TED packed column (Macherey-Nagel) was equilibrated using 2 mL of the phosphate buffer described above. Soluble proteins (2.8 mg) were then loaded onto the column. The column was washed with 4 mL of the same buffer. Proteins were eluted with the same buffer supplemented with 250 mM of imidazole and fractions of 250 μ L were collected.

Quantitative PCR

Total RNA were extracted from around 2.5×10^7 yeast cells obtained from a 48 h culture using a Monarch® Total RNA Miniprep kit (New England Biolabs), according to manufacturer's instructions. Briefly, yeast cells were lysed using 1 mL of glass beads (425 - 600 μ m) for 5 times 30 seconds in a bead-beater. Genomic DNA was retained on a Monarch gDNA removal column, then total RNAs were retained on an RNA purification column. Following an on column DNase I treatment for 15 min at room temperature, total RNAs were eluted with water. Each RNA sample (5000 ng) was used for retrotranscription, which was performed under standard conditions with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamer primers. Quantitative PCR was performed on 5-fold diluted sample using iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). A fragment of *AtPLD* (100 bp) was amplified using the following primers 5'-GCCTTGGCATGACATTCACT-3' and 5'-GAGCAAGCAGGGTGGTAAAG-3', and the reference gene *ARG4* (49) was also quantified in parallel using 5'-GTGGGCAGAAGGGAAGTTTG-3' and 5'-TTGGTCGTGGAATCTCTGGT-3'. Authenticity of the amplicons was confirmed by sequencing the PCR product. Relative quantification of the copy number was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (50) with $\Delta C_t = C_t$ of target (*AtPLD*) – C_t of reference (*ARG4*).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm S.D. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with post-hoc test. Samples were considered to be significantly different for $P < 0.05$.

Results

Analysis of plant PLD α protein sequences

First we used various public databases to gather a maximum of α -type plant PLDs with the PLD α from the model organism *A. thaliana* as a bait. All PLDs found must have the typical HKD catalytic motif duplicated in their primary structure. We were able to retrieve a complete α -type PLD sequence from >200 different organisms, as mosses, liverworts, Gymnosperms and Angiosperms (Figure 1). At least one PLD α sequence was found in most of the organisms we analyzed, several fragments of PLD α were even found in the fern *Adiantum capillus-veneris* (TST39A01NGRL0007_D22, TST39A01NGRL0026_O22) demonstrating that this lipolytic enzyme is well conserved and distributed among all plant families. Phylogeny analysis shows that PLD α from diverse organisms are well reassembled inside their own families, as an example PLD α from Brassicaceae are grouped together as the one's from Solenaceae (Figure 1), suggesting that PLD α have been maintained in genomes during evolution and have evolved from a single ancestor along plant evolution.

Our initial work to collect PLD sequences from green plants did not allow us to identify sequences in algae with the criteria that we postulated to identify canonical PLD α . However, an unusual PLD from the microalga *Coccomyxa subellipsoidea* was spotted. Strikingly, as described recently (51), this sequence did not harbor one of the two classical HKD motifs, the second one being substituted by an unorthodox HKS motif, and some internal residues seemed to be missing. It would be possible that the catalytic motif would have been different among Viridiplantae, and that PLD from algae would have had a completely different structure compared to PLD α from Embryophytes. However, by examining carefully the genomic sequence of this microalga that was recently published (48), the edited ORF around the catalytic motifs was doubtful. We then decided to clone and sequence the cDNA obtained by RT-PCR using primers designed according to the genomic sequence uphill of the presumed ATG and downhill of the presumed stop codon. The cloned sequence obtained showed undoubtedly that this PLD from *C. subellipsoidea* harbors two HKD sequences, and that the previous sequence obtained by *in silico* splicing contained several mistakes; a corrected sequence was then deposited in Genbank under the accession number MG807645. Interestingly, using this microalgal PLD as a bait, we were able to identify another PLD of the α type in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (XM_002180282.1) which is quite interesting, this microalga being a model for lipid engineering, and the PA-releasing PLD being at the crossroad of both phospholipids and triglycerides metabolic pathways.

All the 209 plant PLD α found (Table S1) were then aligned, and a new consensus sequence has been built both to identify the conserved residues and to show its score of conservation (Figure 2). This consensus sequence is 924-residue long and contains 807 positions filled with a residue, the remaining 117 positions being filled by a gap in most of the sequences. PLDs retrieved contain from 800 to 834 residues, and 810 residues on average. Out of the 924 residues, 138 (15%) are strictly conserved among all 209 plant PLDs, 376 (41%) are more than 95% conserved and 479 (52%) are more than 90% conserved. If some residues as the ones of both HKD motifs are well known to be conserved, this alignment highlights some new regions that are conserved and are probably of high importance for the PLD function.

Two motifs appear to be particularly conserved (the following underlined residues are conserved at 100%). First, the consensus P471-H479 (PREPWHDIH) (Figure 2) was identified as well as a conserved region between mammalian and yeast PLD (31, 52). Secondly, the consensus G777-D786 (GSANINQRSM) also called GSRS motif (or conserved region IV, CRIV) (33) was described as involved in a critical step of catalysis through modification of seryl residues by

transphosphatidylation during the catalytic step of enzyme activation (33). Another consensus sequence F609-G619 (FIYIENQYFLG) that was used to retrieve PLD α was also known to be a IYIENQFF motif (or conserved region III, CRIII) (33) and is thought to allow the interaction of the choline head of PC with PLD *via* the aromatic residues of this sequence (53). In contrast conserved region Ib (CR Ib) (33) around residues L314-D331 has undergone more variation during plant evolution, only L314, G321 and W329 are strictly conserved (Figure 2).

Moreover, it appears that some of these 138 strictly conserved residues in plant PLD α are also present in human PLDs as well: 7 residues are only found in PLD2, 1 residue is only found in PLD1, 8 residues are closely similar -but not identical- in both enzymes, but 74 residues are found in both PLD1 and PLD2 (Figure S1). If these residues are conserved in plants and human PLDs, they must be crucial for the catalytic activity and/or the structure of the enzyme which led to the hypothesis that these residues have undergone a selective pressure during evolution.

Interestingly, one of the most diverse region in the sequence alignment of all plant PLDs is situated at the N-terminal extremity between the 18th and the 64th residues. It is well known that the PLD α purified so far have undergone a PTM described as a cleavage of thirtyish-fortyish residues at the N-terminal extremity (21, 23, 25–28, 54). This PTM is found both when PLDs are directly purified from plants and when PLDs are expressed in a recombinant system as *P. pastoris*, which means that this region is probably recognized both by plant and yeast proteases. It is possible as well that during the evolution this non-conserved region has progressively evolved in plants with the system responsible of the cleavage, or that this N-terminal region behaves as a fragile protuberance accessible to proteases.

Taking together, this bioinformatics work highlights new residues that seem to be of prime importance for PLD catalytic activity.

Determining the minimal domain for plant PLD α activity

If the function of the C-terminal of PLD extremity has already been shown to be crucial for catalytic activity both in plants (40) and mammals (39), the real function of the N-terminal of PLD α extremity remains obscure. Using SignalP (55) and the sequence of the PLD α from *A. thaliana*, no signal peptide is predicted but a cleavage site is identified between residues A35 and N36 with a weak score of 0.168. The overproduction of this protein expressed in *P. pastoris*, then purified, had allowed the determination of N36 as the first residue of the purified protein (21). We consequently performed serial deletion of the 5' extremity of *AtPLD α* and checked for PLD activity (Figure 3). First the PLD α Δ 0 was used as the wild-type (wt), it represents the same sequence as *PLD α* used in the mutagenesis study but cloned for convenience in different restriction sites of pGAPZB. The different constructions were designed by sequential deletions (Figure 3C) of the C2 domain, principally removing each β strand (Figure 3A).

At the exception of PLD α Δ 70 that will be discussed latter, none of the different constructions led to a measurable PLD activity, the detected absorbance being in the range of the background measured with cells transformed by the empty vector (control) (Figure 3B). PLD activity is measurable only with PLD α Δ 0. PLD α Δ 35 corresponds to the form of the purified protein found when PLD α is expressed in *P. pastoris* (21), at the exception that a Met is added at its N-terminal extremity. Adding this single residue led to an inactive enzyme. When we checked the expression of the recombinant protein in these different constructs using an antibody raised in rabbits against the 117 residues of the C2 domain, the recombinant protein could be detected around 90 kDa from the PLD α Δ 0 until the PLD α Δ 106 constructs (from a decreasing theoretical size of 91.7 kDa to 80.1 kDa respectively) (Figure 3D), demonstrating that at least the Δ 35, Δ 50, Δ 82, Δ 93, and Δ 106

versions are inactive forms of the truncated PLD. The antibody not being able to recognize the shorter versions $\Delta 119$ to $\Delta 164$, we can only speculate that these versions are inactive as well, the C2 domain being drastically shortened or absent in these constructs. The case of $\Delta 70$ was at first puzzling because enzyme activity and expression of recombinant protein were sometimes detected, sometimes not, with inconsistent results between activity and level of expression depending on the clone tested, leading to the hypothesis that this version of the protein was particularly labile. We consequently checked both enzyme activity and presence of the protein on 9 freshly obtained transformants. As shown in Figure 3E, the PLD activity was above three times the background of the control for 7 out of 9 transformants and the protein could be detected in clones n°2 to 9 with expression in clone n°1 being barely visible (Figure 3F). We must state the high variability of PLD activity that ranges from 15 to 78% of the wt activity between these nine $\Delta 70$ transformants was observed only for this construction, the usual standard deviation of the mutants of Figure 5 being at the maximum of $\pm 37\%$ for mutant S348A. This experiment proves that the C2 domain does not have to be intact for the enzyme to be active, that β strands 1 to 3 are dispensable to get an active enzyme, but others β strands of the C2 domain are not.

Analysis of the cleavage site of plant PLD α

We previously demonstrated that the integrity of the enzyme was mandatory for the catalytic PLD activity, the single deletion of the propeptide led to an inactive enzyme. Surprisingly the propeptide appears to be cleaved when the PLD is analyzed after purification on a hydrophobic/affinity chromatography (21). This cleavage might result from the action of a protease, however to our knowledge nothing has been reported on such a proteolytic cleavage for PLDs. The literature is filled with proofs that the purified enzyme is truncated by around 35 residues at the N-terminus extremity (21, 23, 25–28, 54). Hypotheses are ranging from the importance of the propeptide to fold the protein and protect from degradation (54), to the fact that it could be a signal peptide (25) potentially addressing the protein to the vacuole (28), or a peptide anchoring the protein to the membrane (56) as for the palmitoylation of human PLD. It remains that only speculations about its function, properties or cleavage have been proposed so far. We should note however that the single proof of a potential cleavage by a protease is an interaction that has been described in cardoon between an aspartic proteinase called cardosin A and the C2 domain of PLD α leading to the cleavage of the C2 domain when the complex is disrupted (57), the binding motifs for C2 domains being RGD/KGE sequences.

A similar cleavage is observed in the yeast *P. pastoris* when PLD α are recombinantly expressed (21, 28). This yeast contains the proteinase PEP4 (58), a vacuolar aspartic proteinase precursor similar to *S. cerevisiae* PEP4, both having together 68% of identity and 82% of similarity. Moreover, PEP4 is one of the best match of Cardosin A homologs among yeasts. Cardosin A, PEP4 from *P. pastoris* and PEP4 from *S. cerevisiae* are three aspartic proteinases that bear a matching interacting motif: RGD for cardoon, KGD for *Saccharomyces* and EGK for *Pichia*. The *P. pastoris* strain SMD1168 was consequently used because of its mutation in the gene *pepA*. We used these strains SMD1168 and X33 to produce the *A. thaliana* PLD α fused with an 6xHis-tag at the N-terminus extremity. In the wild-type strain, the specific PLD activity in the crude extract was the same the protein having or not its tag, and in SMD1168 we could not enrich in PLD activity after a purification on a Ni-affinity chromatography (data not shown). Taking together, it seems that the 6xHis-tag at the N-terminus extremity was cleaved and did not impaired the activity of the protein and that PEP4 was not responsible of the cleavage.

Consequently, we decided to mutate the residues on both sides of the cleavage site using the 6xHis-tag version of the protein, postulating that a modification of such a site would prevent its cleavage by a site-specific protease. The activities of single mutants A35L and N36A, and double mutant A35H N36M were then compared in the loading fraction on Ni-TED resin, and the expression checked using an antibody against either the 6xHis-tag or the PLD α -C2 domain (Figure 4). The PLD fused to its tag could be detected with each antibody in a crude extract (Figure 4A), meaning that the protein is expressed, and at least a part of the protein has still its tag. The presence of the tag was confirmed with the purification of the tagged protein by Ni-affinity chromatography, and the PLD was again detected with each antibody in the purified fractions (Figure 4B), demonstrating that (i) the tag is present in the N-terminal PLD extremity, and (ii) in these native conditions of purification the tag is not buried inside the protein, but accessible to bind the resin.

As already observed in the SMD1168 strain, in the X33 strain the PLD activity was similar between the wild-type enzyme and the 6xHis-tag fused enzyme, contrary to a soluble crude extract from a clone transformed with the void plasmid taken as control (Figure 4C). When the PLD activity was measured in the crude extract, the enzyme activity detected with constructions A35L, N36A and A35H N36M was in the same range as the one of the control, meaning that the mutations A35L and N36A around the cleavage site and far from the catalytic region abolished also the PLD activity. The answer for the double mutant A35H N36M is not definitive as a quite low activity but systematically above the background was always observed in different sets of experiments.

Unfortunately, the PLD activity in the elution fraction from the Ni-TED column could not be measured as the phosphate buffer used for the purification was strikingly the only one among different buffers tested that not allowed the wild-type enzyme (*id est* without a His-tag) to bind to the Ni-TED column in a nonspecific way and to be eluted when imidazole is added, and as the presence of phosphate in the enzymatic test induced a precipitation of calcium ion added and required to activate the enzyme.

Finally, results for the $\Delta 36$ truncated 6-His tagged version of the protein are not displayed as they remain equivocal. PLD activity has never been detected in the crude extract of all transformants tested, but we cannot definitively conclude if the protein is produced, as multiple attempts to show the expression of the protein by immunoblot failed to show reproducible data suggesting that this mutated protein is either very poorly expressed or particularly labile and/or instable.

Taking together, this work demonstrates that (i) at least a fraction of the AtPLD α produced does not undergo a proteolytic cleavage as the tag fused to the protein could be still detected (ii) adding a tag at the N-terminal extremity does not impair the activity of the AtPLD α as it was observed for the same tag but located at the C-terminal extremity (21), (iii) the cleavage site is crucial and has to be preserved to allow a functional enzyme to be produced.

It would be quite interesting now to determine the relative proportions of cleaved and uncleaved forms of PLD, and check if the uncleaved form is able to be purified *via* a Ca²⁺-mediated hydrophobic interaction chromatography on Octyl-Sepharose as it was done for the cleaved form (21). This interaction has been postulated to be mediated *via* the C2 domain, having a longer C2 domain fused to a 6xHis-tag may modify the PLD interaction with the resin.

Mutation of conserved residues among plant PLD α around the HKD motifs

Our initial attempts to work with the PLD α from *A. thaliana* expressed in *E. coli* was unsuccessful, even if the protein was found to be present in high amounts as revealed by SDS-PAGE analysis in a whole cell extract, no detectable PLD activity could be measured under these conditions in the

soluble fraction (data not shown). This result was quite puzzling since the PLD α from *Brassica oleracea* an organism close to *A. thaliana* (both PLDs having 94% identity) was expressed in *E. coli*, purified and found to be active (40). The PLD α from *R. communis* was expressed as a functional enzyme in *E. coli* as well, only when the 30-residue N-terminal leader sequence is present, the protein being inactive when the leader sequence was omitted (54). Using 1,2-dipalmitoyl-3-phosphatidyl-[methyl-³H]choline as substrate, others were able to measure the PLD activity (around 1.0 nmol/min/mg) of the purified wild-type protein(35) which is eight times fewer than the PLD activity detected in the crude extract of the protein expressed in *P. pastoris* (this work). It is always possible that only a small amount of the protein folds properly in *E. coli*, and/or that the differences in substrate or in the sensitivity of the technique used to measure the PLD activity leads to this disparity. Moreover *P. pastoris* seems to be a more interesting expression system because of the N-terminal PTM that is allowed in these eukaryotic cells, which seems similar to the one found in plants. It is obvious that PLDs expressed in *E. coli* are not matured: the 6-His tag at the N-terminal extremity allowed the purification on a nickel-affinity chromatography (35), which could exclude that PLD undergo an autocatalytic mechanism that cleaves itself. Interestingly, in our hand the non His-tagged version of AtPLD α was somehow able to bind to a nickel resin in a nonspecific way (data not shown).

To verify as a proof of concept at the starting point of the project that *P. pastoris* was a suitable expression system to screen mutations of AtPLD α , we first mutated individually the residues of the two HKD motifs (H332, K334 and D339 for the first one; H661, K663, and D668 for the second one). Replacing each of these six residues by an alanyl residue led to the total disappearance of the activity compared to the wild-type version of the protein, the activity being comparable to the background measured in cells transformed by the empty vector (Figure 5A). As it was previously shown for PLD from other organisms such as *Yersinia pestis* (34), cabbage (40), human (33), yeast SPO14 (33), *Streptovercillium cinnamoneum* (59), and *Streptomyces septatus* (60), these residues are involved as well in the AtPLD catalytic mechanism. Using an antibody directed against the C2 domain of AtPLD α , we showed by western-blot analysis (Figure 5B) that the recombinant protein was expressed in a similar fashion as the wild-type protein.

We next sought for other residues that we identified using bioinformatic tools. First, H332 thought to be the canonical catalytic residue of the first HKD motif is preceded by another histidyl (H331) that is 100% conserved in all PLD α identified (see Figure 2). The mutation H331A totally abolishes the activity as H332A does (Figure 5). The mechanism currently accepted for PLD proposed that H332 is responsible of the nucleophilic attack of the substrate which led to a phospho-histidine intermediate (2, 61), but no role has been proposed yet for the downstream residue H331 which seems to be also critical for the catalysis.

Because until now all designed mutations of conserved residues in this work have abolished the PLD catalytic activity, we decided to check the mutation of a labile residue. The randomly obtained mutation A289V was chosen because this alanyl residue is found in only 93% of the sequences identified in this work (Figure 2) and is sometimes replaced by a valyl residue as found in *Rosmarinus officinalis*. The A289V mutation did not alter dramatically the activity of the recombinant protein (Figure 5A), clones with this mutation having more than 40% of the wild-type activity with a similar level of protein expression as detected by western-blot analysis (Figure 5B).

Interestingly during the analysis of mutants, PLD activity could not be detected in 3 independent transformants for several mutations of strictly conserved residues: D669A, D689A, P771A, G778A and G798A (Figure 5A), neither the recombinant protein, at least for the single clone that

was tested on SDS-PAGE for expression. We hypothesized that the mutation of these crucial residues somehow destabilizes the 3D structure of the protein, exposing new regions that may lead to the proteolytic degradation of the protein. Because transformation of *P. pastoris* implies the random integration of the PLD transgene anywhere in the genomic DNA, and to rule out the transgene integration in a poorly transcribed region, we analyzed the expression of the transgene by qPCR in these particular clones using primers located at the 3' extremity of *AtPLD α* (Figure 6). Compared to the wild-type clone, the expression of the transgene was not different in almost all of these mutants (Figure 6A). However, the recombinant protein could not be detected at all by western-blot analysis for G798A, the protein was barely visible for D689A, the level of expression was quite different among the three clones tested for P771A and G778A, and the expression of D669A was much lower than the wild-type (Figure 6C) demonstrating that the transcription was not an issue in these mutants, but that translation or folding were impaired, or that PTM or protein degradation occurred. It is interesting to note that H333D and D340E mutations of PLD from cabbage – corresponding to H332A and D339A in the PLD from *A. thaliana* - showing no PLD activity *in vitro* could not be purified by the Ca²⁺-mediated hydrophobic interaction chromatography on Octyl-Sepharose (40) leading to the hypothesis that point mutation may provoke a different folding of the protein. It is consequently plausible that mutations D669A, D689A, P771A, G778A and G798A dramatically changed the structure and/or the stability of the recombinant protein.

Out of 31 strictly conserved residues tested, the mutation Q552A is particularly noticeable, because it is the only one that did not abolish the PLD catalytic activity. This result is quite paradoxical: on the one hand the Q522 residue is invariantly conserved in all PLD α (Figure 2), on the other hand the mutation did not alter the catalytic activity (Figure 5A). It is still possible that this residue would be important for other functions *in planta* as protein localization or membrane targeting. It would be interesting to test this particular mutation in the plant *plda1* mutant to check if lipid composition is restored in organs where PLD α plays a key role (62), and if this mutation still permits an adequate response to drought (63).

Mutation S348A is noticeable as well, not only because this mutant is still active (Figure 5A), but because the S348 residue located just after the first HKD motif is in mirror with S676 of the second HKD motif defined as HXKX₄DX₆GSXN (15). To our knowledge, it is the first time that this particular residue (or equivalent in other PLDs) is mutated and shown to be dispensable for activity. However, mutation S676A led to an inactive enzyme (Figure 5A), consequently the model proposed for the catalytic site of dimeric Nuc (15) where these two seryl residues hydrogen-bond to the side chain of glutamyl residues has to be modified for the monomeric plant PLD (64) where these two seryl residues are clearly not equivalent.

The first HKD motif has been described as HXKX₄D, however another histidyl residue H331 is located just before the H332 of the HKD. This residue is strictly conserved among plant PLD α (Figure 2) and in human PLDs (Figure S1). Mutation H331A led to an inactive enzyme as H332A did (Figure 5), suggesting that both residues are required to be intact to allow a catalytic reaction. It is not clear yet what is the relative role of these two identical residues in close vicinity, however considering the remarkable occurrence of the duplicity of these residues, we propose an extended version of the first HKD motif as HHXKX₄D.

Similarly, in the second HKD motif, the catalytic aspartyl D668 is followed by another one D669. Once again, this residue is strictly conserved among plant PLD α (Figure 2) and in human PLDs (Figure S1). The mutation of each residue, either D669A or D668A, also abolished the PLD activity (Figure 5A). It seems that the mutation of D669 drastically change the protein as the

mutated enzyme cannot be detected in the crude extract (Figure 5B) or is poorly expressed compared to the wild-type (Figure 6C) depending on the revelation conditions, especially the duration of the chemiluminescence detection.

Preceding the second HKD motif, mutation Y659A abolished the PLD activity as well. Inside this second motif, mutations in I666 as in G675, S676, A677, N678, N680, R682, S683 and M684 forming the GSANXNXRSM sequence abolished the PLD activity when mutated by an alanyl (or by a valyl for A677 and M684). The second HKD motif described in the literature as HXKK₄DX₆G(G/S)XN can now be proposed to an extended version, for PLD α at least, of this catalytic motif as YXHKKX₂IXDDX₆GSANXNXRSM.

Mutation of residues that are common with human PLD

AtPLD α and human PLD1 and 2 share the same catalytic motifs as mentioned previously, but some other residues are identical as well between the 3 enzymes (Figure S1). We consequently investigated the importance of some of these conserved residues. So far, the accepted mechanism for PLD proposed the formation of a phospho-histidine intermediate before the releasing of the PA and the free enzyme (11, 15, 65).

Based on the crystal structure of the PLD from *Streptomyces sp.* strain PMF (11), D202 and D473 were postulated to stabilize H470 and H170 respectively, these residues being the histidyls of the two bacterial HKD motifs (66). A basic alignment of AtPLD α and the PLD from *Streptomyces sp.* strain PMF allowed the identification of D407 as the equivalent of D202, this hypothesis is reinforced by our models of AtPLD α that clearly put D407 at a decent distance of the catalytic histidine H661. The identification of the equivalent of D473 is not possible using an alignment, as the C-terminal sequences do not properly align. However, using our models we can identify D689 or E691 as putative analogs to D473 of *Streptomyces sp.* strain PMF. E691 is probably the best candidate considering alignment of the two lobes of AtPLD α (Figure S2). These three residues D407, D689 and E691 are perfectly conserved among plant PLD α (Figure 2) and with human PLD 1 and 2 (Figure S1). When we tested the mutations D407A, D689A or E691A, the recombinant protein lost its catalytic capacity (Figure 5A). Data for D689A are puzzling as the protein barely being expressed at the protein level compared to the background observed in the control (Figure 6C). Depending on the clone tested and its detected protein expression level, it is possible that this particular mutation destabilized the protein leading to its degradation. As an example, the first clone of mutations P771A and D669A having roughly the same RNA expression RNA level (Figure 6A) and being assuredly transformed with the transgene (Figure 6B) have quite different protein expression level (Figure 6C). As shown by others in *Y. pestis*, substitution of the conserved aspartic acid in either HKD domain rendered the enzyme Ymt insoluble (34), demonstrating that this residue is probably crucial for the folding or the stability of the protein. Moreover, this residue is not buried inside the enzyme, as this region was located at the outside of the enzyme in different PLD structures (11, 15).

Mutations P401A, R402A, P404A, W405A located in close vicinity abolished the PLD activity (Figure 5A). This sequence in between the two HKD motifs and identified as a conserved region between mammalian and yeast PLD (31, 52) is consequently important for plant PLD catalytic activity too. Mutation K261A abolished the activity as well demonstrating that this residue that is common with human PLDs (Figure S1) is important as well.

Mutations P771A, G778A, and G798A abolished the PLD activity, the latest protein is not detectable by western-blot (Figure 6C) even if the transgene expression level of two clones at least is comparable to the expression detected in the wild-type (Figure 6A).

Taking together these residues found both in plants and in human PLD1 and 2 seem to be crucial to get an active form of the enzyme.

Mutation of other conserved residues

At the N-terminal extremity and between the 2 HKD motifs, random mutations A85S, R65G, P208S, and P415T abolished the PLD activity (Figure 5A), however the nature of the replacing residue may explain the loss of activity, prolyl residues are known to interrupt secondary structures, these mutations could extend strands and helices.

In the hydrophobic motif FTVYVVV, mutation F565A abolished the PLD activity (Figure 5A). Finally, all the mutations of the PX₂(L/I)T(T/S) motif abolished the PLD activity as well. Indeed, mutations P805A, T809A, T809S and T810A led to an inactive enzyme (Figure 5A).

A new structural model proposed for eukaryotic PLDs

So far, only the crystal structure of the prokaryotic PLD from *Streptomyces sp. PMF* has been solved (11). This structure shows a bilobed enzyme with each lobe bearing an HKD motif. There are no 3D-structures of eukaryotic PLDs, even if a SAXS model shows a symmetric enzyme with an ovoid shape and loosely structured tops (64). Based on these observations and on our previous results, we decided to build a new model for the structure of the catalytic core of plant PLD α .

PLDs are mostly differing by their regulatory domains (C2, PH or PX domains for example) where no sequence homology is found between each other. Four typical motifs called I, II, III and IV are well conserved among PLDs and are repeated twice in the primary sequence (1) forming a catalytic core, we consequently postulated that the global topology of AtPLD α would be conserved. To understand the topology of PLDs, we further used the AtPLD α sequence deleted of its C2 domain, thus, the catalytic core of the enzyme starting at residue V151 is 660-residue long and is presumably composed of two lobes as other HKD-type PLDs (11). Separating the catalytic core in equal halves is an option to distinguish the two lobes, however individual lobe secondary structure prediction shows that a common β -strand can align together between the beginning and the end of the N-terminal lobe. Hence, we decided to build a first lobe shortened by 23 residues and finishing at E457, this lobe is then 307-residue long, the second lobe starting at D458 is 353-residue long (Figure S2).

A sequence alignment of the two lobes of AtPLD α shows that the four motifs are mostly matching together and are quite well aligned together with similar biochemical properties. The PROMALS3D server allowed us to determine similar secondary structures between the two lobes (Figure S2).

To describe the common topology found in both lobes we decided to omit the secondary structures of less than four residues, and the secondary structures where the sequences do not match together. Thus, we predicted that each lobe would share a topology like β - β - α - β - α - β - α - β - β - β - α - β (Figure S2).

In parallel we built a 3D homology model of AtPLD α catalytic core by using the Phyre² server in intensive mode (Figure 7A). This server looks by itself for a homologous structure and did use the one of *Streptomyces sp.* strain PMF PLD (PDB id: 1F0I) which shares only 18% of sequence identity with AtPLD α . However, both AtPLD α and PLD from *Streptomyces* have the same catalytic function, and have their four typical motifs that aligned together, so we hypothesized that both proteins will share a similar structure, (i) the two lobes are facing each other as if in a mirror, (ii) the protein is in a horse saddle shape with the catalytic site at the middle. However, this model cannot be satisfactory by itself to construct the tertiary structure of PLDs because of its poor

sequence identity, even if similar models have been obtained with other servers. In fact, a comparison between the predicted topology (Figure S2) and the topology built by homology (Figure 7A) highlights two major differences: (i) there were two supplementary α -helices in the N-terminal lobe, one is modeled in place of a β -strand at the beginning of the sequence, and the other is inexistent in our prediction, (ii) the C-terminal lobe is also quite different without the first two β -strands and an α -helix replacing a β -strand at the end of the sequence. These differences between our prediction and the homology model are mostly due to our omissions, that have been established earlier, of shorter secondary structures and the ones that did not match between each lobe.

Using the predicted topology based on primary sequence and the one built by homology, we kept only the ones that are conserved, and postulated on a global structural topology (Figure 7B) with two major aspects: (i) both lobes carry at least four α -helices and six β -strands as the principal secondary structures, (ii) in each lobe, the six β -strands are forming a β -sheet with three α -helices in support on one side (exterior of the protein) and a fourth α -helix on the other side (facing the other lobe).

For plant and mammalian PLD, the C2, PH and PX regulatory domains structures have already been solved (67–69). What remains, currently, is to position the regulatory domains relative to the catalytic core. Structural studies using a homogenously purified plant enzyme has to be investigated to identify the position and the dynamic of the C2 domain in plant PLD.

Discussion

Taking the facts that adding a single Met before A35, mutating either A35 or N36 or deleting several residues of the C2 domain, abolish the enzyme activity, this work allowed us to state that the N-terminal extremity, its length and residue composition, are crucial to get an active form of PLD α . It is still unclear which is the protein accountable of this PTM. Cleavage of PLD α by itself could be excluded as PLD α expressed in *E. coli* kept its leader sequence (29) and the protein became inactive in this system when the leader sequence is removed by genetic engineering (54). It is puzzling that the same exact cleavage site could be found when a PLD is expressed in various organisms as different as the yeast *P. pastoris* (28) or the insect *Spodoptera frugiperda* (27). Assuming that an endogenous protease is responsible of this cleavage, yeast would be a convenient tool to discriminate which one of the different proteases is involved, as several libraries of clones are available where these enzymes are systematically mutated. Yeast genome encodes a total of 121 proteases with a viable knock-out phenotype (70) that could be tested to identify the protease responsible for the cleavage.

The F565 residue belongs to the EKF motif of PLD α 1, a motif analogous to the DRY motif present in many GPCRs and through which the enzyme could interact with the heterotrimeric G-protein α -subunit (35). Interestingly, when the same mutant F565A was expressed in *E. coli* (35), any difference in the enzyme catalytic activity could be observed compared to the wild-type, the difference in the expression system could probably explain this discrepancy, *P. pastoris* is known to glycosylate recombinant protein (71) which could inactivate the enzyme for this particular mutation. This EKF motif is nonetheless mostly conserved among all PLD α (Figure 2), out of 209 sequences, R564 is found in only 169 sequences being replaced sometimes by K or P, but E563 and F565 are found in 205 and 208 sequences respectively, meaning that these two last residues have been undergone a strict selective pressure during evolution. F565 is replaced by L565 in the single sequence of *Dichanthelium oligosanthes*, but F565 is found in all other PLD α isoforms as

OEL32086.1 or OEL13457.1 in this organism, consequently a sequencing error in this particular sequence cannot be excluded.

It is striking that PLD α are found in all land plants where we looked for its presence, but the origin of this enzyme in plants remains to be elucidated as green algae do not contain such a sequence at the exception of *C. subellipsoidea* or *P. tricornutum* where a horizontal transfer from microbes could be suspected. It is possible that other PLD isoforms could replace PLD α as many other isoforms are detected in algae (51). Algae being now used for biomass or lipid production, and PLD being at the crossroad of triacylglycerol and phospholipids pathways *via* PA production, the identity and implication of the different PLDs have to be determined in order to engineer these cell factories (72).

Comparing plant and mammals PLDs is a powerful tool to identify residues that have undergone a selective pressure during evolution, and at the opposite regions that have freely diverged. The C and N-terminal extremities are perfect examples about it: among plants the C2 domain is one of the region with the most variability and the C-terminal is more conserved. This C2 domain along with PH and PX regulatory domains are not restricted to PLDs but often found in other types of enzymes (2). The C-terminal extremity of human PLD has been postulated to interact with the catalytic site (39) which is buried inside bacterial PLD structure (11), and previous attempts to modify this extremity have led to an inactive enzyme (37–40). As shown by others (39, 40) for mammalian and cabbage PLD and in this work for plant PLD α , the integrity of the C-terminal extremity of PLD is mandatory for the catalytic activity suggesting an essential role in the mechanism or the structure as would be a terminal peptide potentially buried inside the structure. It is possible that the overall structure of the enzyme is not governed by the N-terminal part that allows the adsorption of the enzyme to the membranes and consequently its substrate, but that the catalytic core would be structured by the C-terminal extremity where less evolution is permitted. So far crystal data have been only obtained from bacterial PLDs (11, 34, 73) that do not have regulatory domains, probably because mammalian (2) and plant PLDs (74) that are totally or partially membrane bound respectively are more difficult to purify for structural studies. The position of the regulatory domains towards the catalytic core and its dynamic during membrane adsorption remains to be elucidated.

As far as the mechanisms and catalytic residues are concerned, both HXKK₄D motifs seem not to be equivalent, as another strictly conserved histidyl is found in eukaryotic PLDs just before the first motif that could be written HHXKK₄D (11), this histidyl being mandatory for catalytic activity (this work). This duplicate residue is found in alignments neither in Nuc (15) nor in Zucchini PLD-like nuclease (75) nor in other members of the PLD superfamily as cardiolipin synthase (2, 76), and interestingly in bacteria this duplicate residue is found in alignments of the second motif that could be written HHKX₄D (11, 76), suggesting that this particular histidyl may be linked to the nature of PLD substrates. Overall, the evolution of an ancestral bacterial dimeric PLD with equivalent HKD being face to face could have led to a monomeric PLD in eukaryotes where each HKD motif may have evolved separately.

Conclusion

We identified new key residues conserved both in plant and human PLDs that are required for enzyme activity. We were able to re-define as well a new consensus sequence around the two HKD motifs that could be extended beyond these sole residues. We showed that length and residue composition of the PLD α N-terminal extremity were important, presumably for the folding of the C2 domain of plant PLDs. We also confirmed that the identity of residues at the PLD α C-terminal extremity is crucial as it was shown previously for mammals PLDs. Together, these data support that plant PLD are still a convenient tool to study all HKD-type PLDs, and to better understand the structure of eukaryotic PLDs.

Author Information

Corresponding Author

*To whom correspondence should be addressed

Tel: +33 4 27 46 57 31

E-mail address: alexandre.noiriel@univ-lyon1.fr

Author Contributions

The manuscript was written from contributions by all the authors. All the authors have given approval to the final version of the manuscript. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Acknowledgments

We would like to thank especially Pavlina Dubois for the cloning of the algal PLD, and Mialitiana Solo Nomenjanahary, Karim Bessaa and Houda Abia for technical help during the mutagenesis steps. We are thankful to Guy Condemine (Université de Lyon) for providing us the *E. coli* dam-strain, and to James L. Van Etten (University of Nebraska-Lincoln) for providing us a *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 culture. We are in debt to Petar Puijic for the help to disrupt the numerous samples of yeast. Dr Mickael Cherrier is gratefully acknowledged for advices on structural modeling. YA was supported by a grant MENRT from the French Ministry of Science and Education. This work was supported by a grant to AN from Ligue contre le cancer, comité de Haute-Savoie.

Abbreviations

PA: phosphatidic acid

PLD: phospholipase D

PTM: post-translational modification

3D: tridimensional

TBS: Tris Buffer Saline

References

1. Ponting, C. P., and Kerr, I. D. (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 Sci. Publ. Protein Soc.* **5**, 914–922
2. Selvy, P. E., Lavieri, R. R., Lindsley, C. W., and Brown, H. A. (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem. Rev.* **111**, 6064–6119
3. Hanahan, D. J., and Chaikoff, I. L. (1947) A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J. Biol. Chem.* **169**, 699–705
4. Nelson, R. K., and Frohman, M. A. (2015) Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *J. Lipid Res.* **56**, 2229–2237
5. Bruntz, R. C., Lindsley, C. W., and Brown, H. A. (2014) Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Rev.* **66**, 1033–1079
6. Roth, E., and Frohman, M. A. (2018) Proliferative and metastatic roles for Phospholipase D in mouse models of cancer. *Adv. Biol. Regul.* **67**, 134–140
7. Sun, Y., and Chen, J. (2008) mTOR signaling: PLD takes center stage. *Cell Cycle.* **7**, 3118–23
8. Sun, Y., Fang, Y., Yoon, M. S., Zhang, C., Roccio, M., Zwartkuis, F. J., Armstrong, M., Brown, H. A., and Chen, J. (2008) Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U A.* **105**, 8286–91
9. Stieglitz, K. (2017) Structural Insights for Drugs Developed for Phospholipase D Enzymes. *Curr. Drug Discov. Technol.* 10.2174/1570163814666170816112135
10. Rudge, S. A., and Engebrecht, J. (1999) Regulation and function of PLDs in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1439**, 167–174
11. Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S., and Hough, E. (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Struct. Lond. Engl.* **1993**, **8**, 655–667
12. Imamura, S., and Horiuti, Y. (1979) Purification of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D by hydrophobic affinity chromatography on palmitoyl cellulose. *J. Biochem. (Tokyo).* **85**, 79–95
13. Magalhães, G. S., Caporrino, M. C., Della-Casa, M. S., Kimura, L. F., Prezotto-Neto, J. P., Fukuda, D. A., Portes-Junior, J. A., Neves-Ferreira, A. G. C., Santoro, M. L., and Barbaro, K. C. (2013) Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie.* **95**, 1773–1783
14. Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L. Y., and Bryant, S. H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* **45**, D200–D203
15. Stuckey, J. A., and Dixon, J. E. (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 278–284
16. Li, M., Hong, Y., and Wang, X. (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**, 927–935
17. Liu, Q., Zhang, C., Yang, Y., and Hu, X. (2010) Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in Poplar and Grape. *BMC Plant Biol.* **10**, 117

18. Qin, C., and Wang, X. (2002) The Arabidopsis Phospholipase D Family. Characterization of a Calcium-Independent and Phosphatidylcholine-Selective PLD ζ 1 with Distinct Regulatory Domains. *Plant Physiol.* **128**, 1057–1068
19. Qin, W., Pappan, K., and Wang, X. (1997) Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLD γ and regulation of plant PLD γ , - β , and - α by polyphosphoinositides and calcium. *J. Biol. Chem.* **272**, 28267–28273
20. Pappan, K., and Wang, X. (1999) Plant phospholipase D α is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca(2+) concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 347–353
21. Rahier, R., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2016) Functional Characterization of the N-Terminal C2 Domain from Arabidopsis thaliana Phospholipase D α and D β . *BioMed Res. Int.* **2016**, 2721719
22. Tiwari, K., and Paliyath, G. (2011) Cloning, expression and functional characterization of the C2 domain from tomato phospholipase D α . *Plant Physiol. Biochem. PPB.* **49**, 18–32
23. Abousalham, A., Riviere, M., Teissere, M., and Verger, R. (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim Biophys Acta.* **1158**, 1–7
24. Wang, X., Dyer, J. H., and Zheng, L. (1993) Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 486–494
25. Ueki, J., Morioka, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (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 Physiol.* **36**, 903–914
26. Abousalham, A., Teissere, M., Gardies, A. M., Verger, R., and Noat, G. (1995) Phospholipase D from soybean (*Glycine max* L.) suspension-cultured cells: purification, structural and enzymatic properties. *Plant Cell Physiol.* **36**, 989–96
27. El Maarouf, H., Carriere, F., Riviere, M., and Abousalham, A. (2000) Functional expression in insect cells, one-step purification and characterization of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Eng.* **13**, 811–7
28. Ben Ali, Y., Carriere, F., and Abousalham, A. (2007) High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Expr Purif.* **51**, 162–9
29. Schäffner, I., Rücknagel, K.-P., Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2002) Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 79–87
30. Rahier, R., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2016) Development of a Direct and Continuous Phospholipase D Assay Based on the Chelation-Enhanced Fluorescence Property of 8-Hydroxyquinoline. *Anal Chem.* **88**, 666–74
31. Hammond, S. M., Altshuller, Y. M., Sung, T. C., Rudge, S. A., Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 29640–29643
32. Xie, Z., Ho, W. T., and Exton, J. H. (1998) Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 34679–34682
33. Sung, T. C., Roper, R. L., Zhang, Y., Rudge, S. A., Temel, R., Hammond, S. M., Morris, A. J., Moss, B., Engebrecht, J., and Frohman, M. A. (1997) Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.* **16**, 4519–4530

34. Rudolph, A. E., Stuckey, J. A., Zhao, Y., Matthews, H. R., Patton, W. A., Moss, J., and Dixon, J. E. (1999) Expression, characterization, and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D superfamily member. *J. Biol. Chem.* **274**, 11824–11831
35. Zhao, J., and Wang, X. (2004) Arabidopsis phospholipase Dalphal1 interacts with the heterotrimeric G-protein alpha-subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 1794–1800
36. Gookin, T. E., and Assmann, S. M. (2014) Significant reduction of BiFC non-specific assembly facilitates in planta assessment of heterotrimeric G-protein interactors. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **80**, 553–567
37. Sung, T. C., Zhang, Y., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1999) Structural analysis of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **274**, 3659–3666
38. Sung, T. C., Altshuller, Y. M., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1999) Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J. Biol. Chem.* **274**, 494–502
39. Liu, M. Y., Gutowski, S., and Sternweis, P. C. (2001) The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 5556–5562
40. Lerchner, A., Mansfeld, J., Kuppe, K., and Ulbrich-Hofmann, R. (2006) Probing conserved amino acids in phospholipase D (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for their importance in hydrolysis and transphosphatidyltransferase activity. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS.* **19**, 443–452
41. Frohman, M. A. (2015) The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 137–144
42. Gomez-Cambrenero, J. (2014) Phospholipase D in cell signaling: from a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* **289**, 22557–22566
43. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248–54
44. Arhab, Y., Rahier, R., Noiriél, A., Cherrier, MV, and Abousalham, A (2018) Expression and Purification of Recombinant *Vigna unguiculata* Phospholipase D in *Pichia pastoris* for Structural Studies. *Methods Mol. Biol.* (in press)
45. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685
46. Dyer JH, Zheng L, and Wang X (1995) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding phospholipase D from Arabidopsis (Accession No. U36381) (PGR 95-096). *Plant Physiol.*
47. Dong, D., Lei, M., Hua, P., Pan, Y.-H., Mu, S., Zheng, G., Pang, E., Lin, K., and Zhang, S. (2017) The Genomes of Two Bat Species with Long Constant Frequency Echolocation Calls. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 20–34
48. Blanc, G., Agarkova, I., Grimwood, J., Kuo, A., Brueggeman, A., Dunigan, D. D., Gurnon, J., Ladunga, I., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Pröschold, T., Salamov, A., Schmutz, J., Weeks, D., Yamada, T., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Claverie, J.-M., Grigoriev, I. V., and Van Etten, J. L. (2012) The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biol.* **13**, R39
49. Abad, S., Kitz, K., Hörmann, A., Schreiner, U., Hartner, F. S., and Glieder, A. (2010) Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. J.* **5**, 413–420
50. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* **25**, 402–408

51. Beligni, M. V., Bagnato, C., Prados, M. B., Bondino, H., Laxalt, A. M., Munnik, T., and Ten Have, A. (2015) The diversity of algal phospholipase D homologs revealed by biocomputational analysis. *J. Phycol.* **51**, 943–962
52. Morris, A. J., Engebrecht, J., and Frohman, M. A. (1996) Structure and regulation of phospholipase D. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 182–185
53. Frohman, M. A., Sung, T. C., and Morris, A. J. (1999) Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1439**, 175–186
54. Wang, X., Xu, L., and Zheng, L. (1994) Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* **269**, 20312–20317
55. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* **8**, 785–786
56. Sato, H., Watanabe, T., Sagane, Y., Nakazawa, Y., and Takano, K. (2000) Purification and Characterization of Phospholipase D from Cabbage Leaves. *Food Sci. Technol. Res.* **6**, 29–33
57. Simões, I., Mueller, E.-C., Otto, A., Bur, D., Cheung, A. Y., Faro, C., and Pires, E. (2005) Molecular analysis of the interaction between cardosin A and phospholipase D(alpha). Identification of RGD/KGE sequences as binding motifs for C2 domains. *FEBS J.* **272**, 5786–5798
58. Gleeson, M. A., White, C. E., Meininger, D. P., and Komives, E. A. (1998) Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Methods Mol. Biol.* **103**, 81–94
59. Ogino, C., Daido, H., Ohmura, Y., Takada, N., Itou, Y., Kondo, A., Fukuda, H., and Shimizu, N. (2007) Remarkable enhancement in PLD activity from *Streptoverticillium cinnamomeum* by substituting serine residue into the GG/GS motif. *Biochim. Biophys. Acta.* **1774**, 671–678
60. Uesugi, Y., Mori, K., Arima, J., Iwabuchi, M., and Hatanaka, T. (2005) Recognition of phospholipids in *Streptomyces* phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **280**, 26143–26151
61. Gottlin, E. B., Rudolph, A. E., Zhao, Y., Matthews, H. R., and Dixon, J. E. (1998) Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9202–9207
62. Devaiah, S. P., Roth, M. R., Baughman, E., Li, M., Tamura, P., Jeannotte, R., Welti, R., and Wang, X. (2006) Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a phospholipase Dalpha1 knockout mutant. *Phytochemistry.* **67**, 1907–1924
63. Hong, Y., Zheng, S., and Wang, X. (2008) Dual functions of phospholipase Dalpha1 in plant response to drought. *Mol. Plant.* **1**, 262–269
64. Stumpe, S., König, S., and Ulbrich-Hofmann, R. (2007) Insights into the structure of plant α -type phospholipase D: Structure of plant phospholipase D. *FEBS J.* **274**, 2630–2640
65. Leiros, I., McSweeney, S., and Hough, E. (2004) The reaction mechanism of phospholipase D from *Streptomyces* sp. strain PMF. Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product. *J. Mol. Biol.* **339**, 805–820
66. Uesugi, Y., and Hatanaka, T. (2009) Phospholipase D mechanism using *Streptomyces* PLD. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**, 962–969
67. Perisic, O., Fong, S., Lynch, D. E., Bycroft, M., and Williams, R. L. (1998) Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **273**, 1596–1604

68. Zheng, J., Chen, R. H., Corblan-Garcia, S., Cahill, S. M., Bar-Sagi, D., and Cowburn, D. (1997) The solution structure of the pleckstrin homology domain of human SOS1. A possible structural role for the sequential association of diffuse B cell lymphoma and pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 30340–30344
69. Stahelin, R. V., Karathanassis, D., Murray, D., Williams, R. L., and Cho, W. (2007) Structural and membrane binding analysis of the Phox homology domain of Bem1p: basis of phosphatidylinositol 4-phosphate specificity. *J. Biol. Chem.* **282**, 25737–25747
70. Spedale, G., Mischerikow, N., Heck, A. J. R., Timmers, H. T. M., and Pijnappel, W. W. M. P. (2010) Identification of Pep4p as the protease responsible for formation of the SAGA-related SLIK protein complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 22793–22799
71. Bretthauer, R. K., and Castellino, F. J. (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30 (Pt 3)**, 193–200
72. Lenka, S. K., Carbonaro, N., Park, R., Miller, S. M., Thorpe, I., and Li, Y. (2016) Current advances in molecular, biochemical, and computational modeling analysis of microalgal triacylglycerol biosynthesis. *Biotechnol. Adv.* **34**, 1046–1063
73. Suzuki, A., Kakuno, K., Iwasaki, Y., Yamane, T., and Yamane, T. (1999) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 317–319
74. Novák, D., Vadovič, P., Ovečka, M., Šamajová, O., Komis, G., Colcombet, J., and Šamaj, J. (2018) Gene Expression Pattern and Protein Localization of Arabidopsis Phospholipase D Alpha 1 Revealed by Advanced Light-Sheet and Super-Resolution Microscopy. *Front. Plant Sci.* **9**, 371
75. Voigt, F., Reuter, M., Kasaruho, A., Schulz, E. C., Pillai, R. S., and Barabas, O. (2012) Crystal structure of the primary piRNA biogenesis factor Zucchini reveals similarity to the bacterial PLD endonuclease Nuc. *RNA N. Y. N.* **18**, 2128–2134
76. Waite, M. (1999) The PLD superfamily: insights into catalysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1439**, 187–197

Figures

Figure 1: Phylogenetic relationship and diversity of plant PLD α .

Figure 2: Residue conservation in PLD α .

Figure 3: Expression of AtPLD α minimal domains.

Figure 4: Western blot analysis of AtPLD α constructs after purification by affinity-chromatography.

Figure 5: Relative enzymatic activity and expression of forty-one AtPLD α point mutants.

Figure 6: Expression pattern of *AtPLD α* in different mutants.

Figure 7: Modelization of AtPLD α .

Supporting Information

Figure S1: Alignment of *Homo sapiens* PLD1 and 2 and *Arabidopsis thaliana* PLD α .

Figure S2: Alignment of lobe 1 (L1) and lobe 2 (L2) of the catalytic core of AtPLD α .

Table S1: List of the 209 plant PLD α with their database origin and accession number.

Table S2: List of primers used.

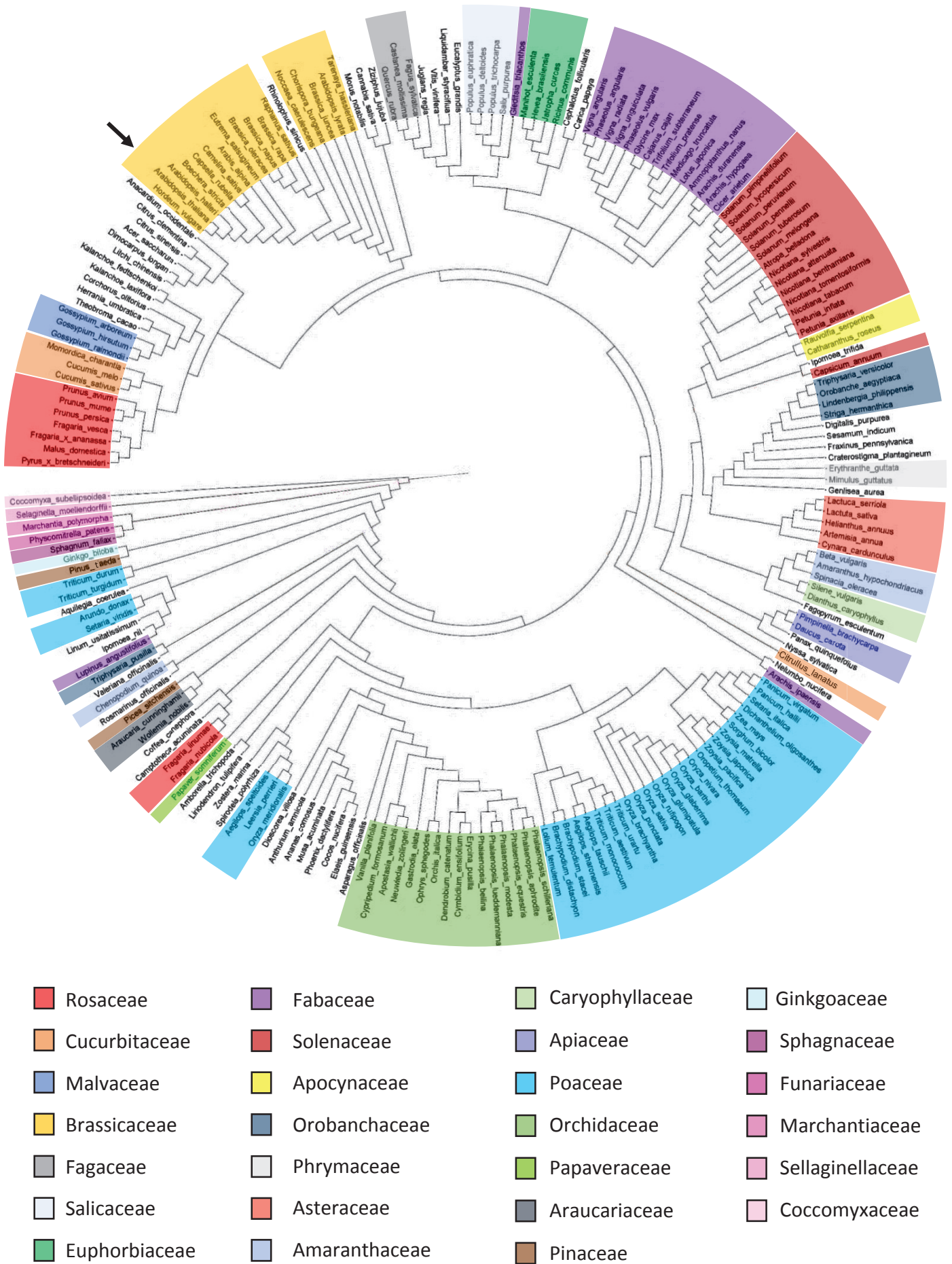


Figure 1: Phylogenetic relationship and diversity of plant PLD_a.

The main plant families are highlighted in color. The PLD_a of *Arabidopsis thaliana* is indicated with a black arrow.

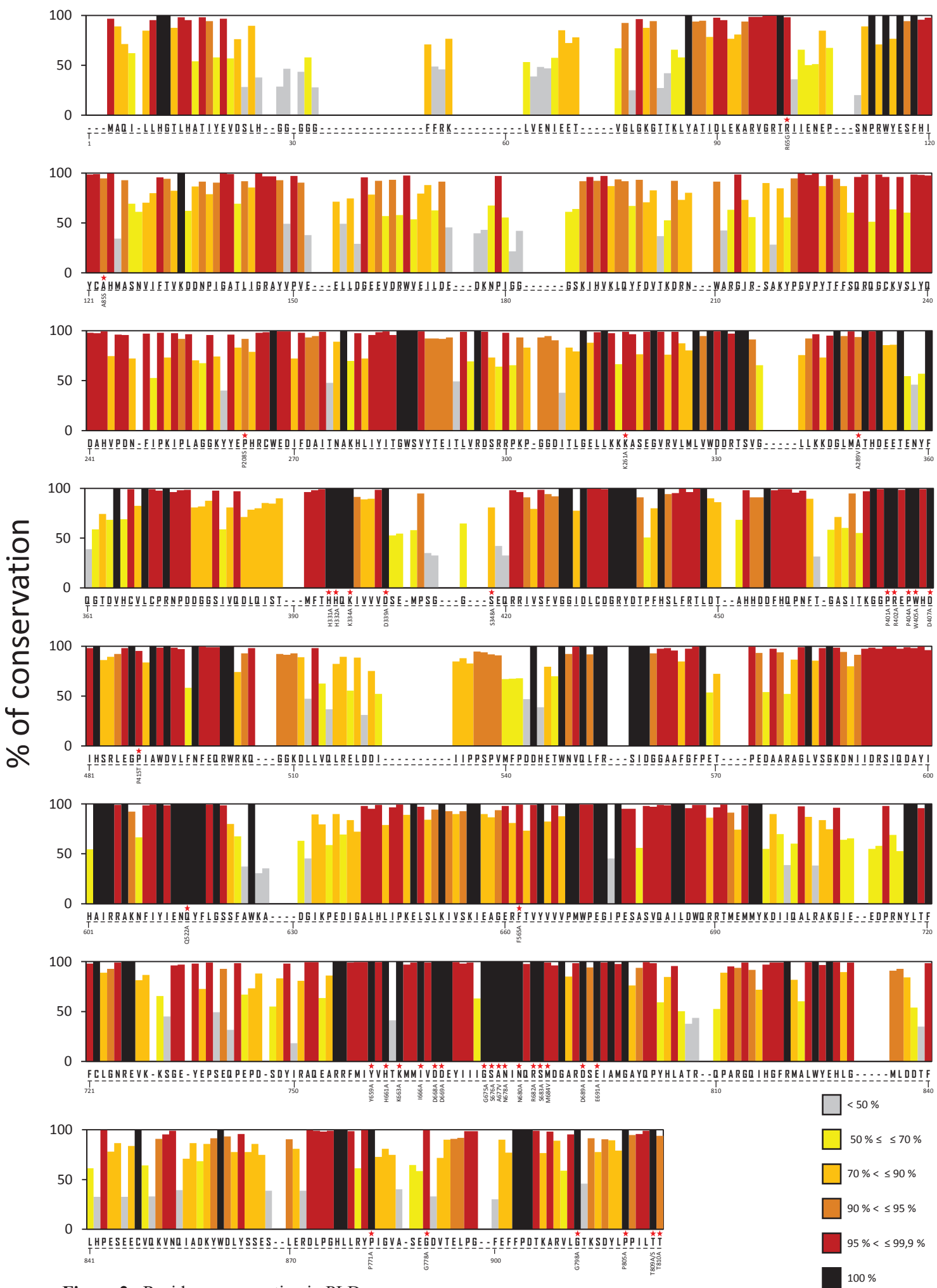


Figure 2: Residue conservation in PLD α .

The histogram of the consensus sequence indicates the score of conservation of each residue in the alignment of 209 plant PLD α , the Y axis represents the percentage of conservation of each residue. Mutated positions in *Arabidopsis thaliana* are indicated with red stars and mutations are indicated just below.

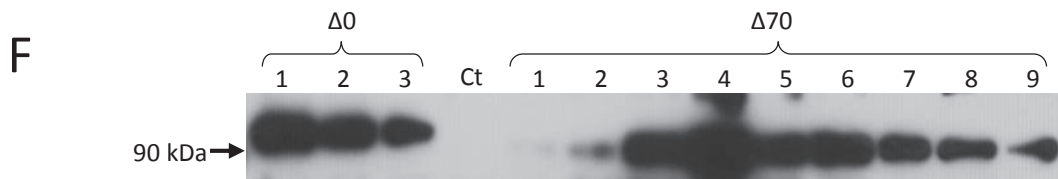
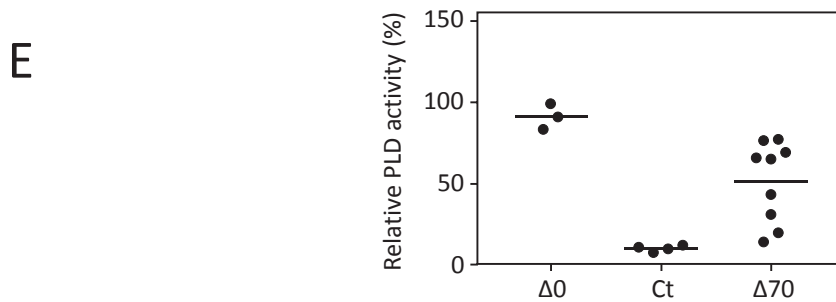
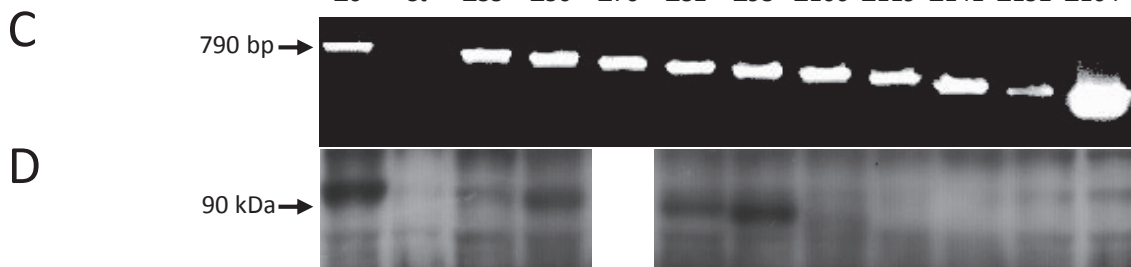
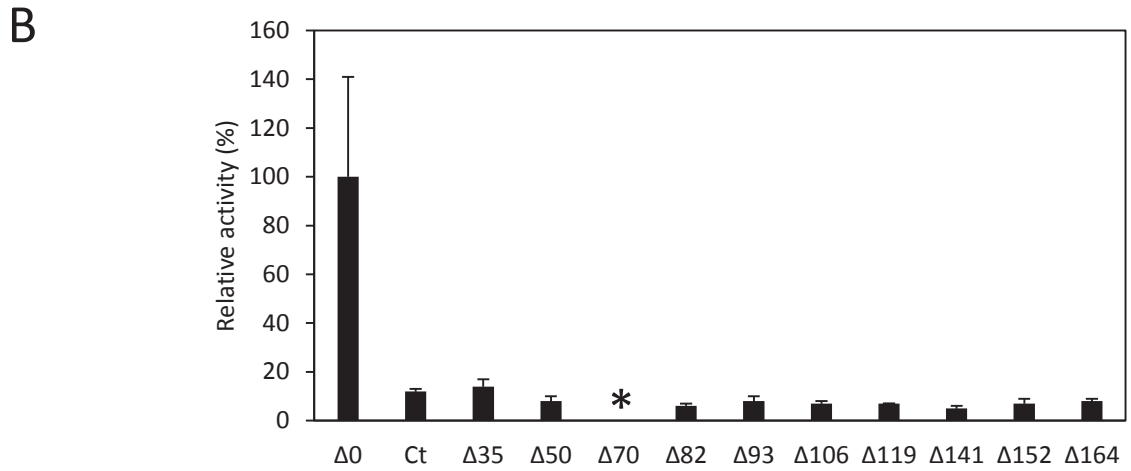
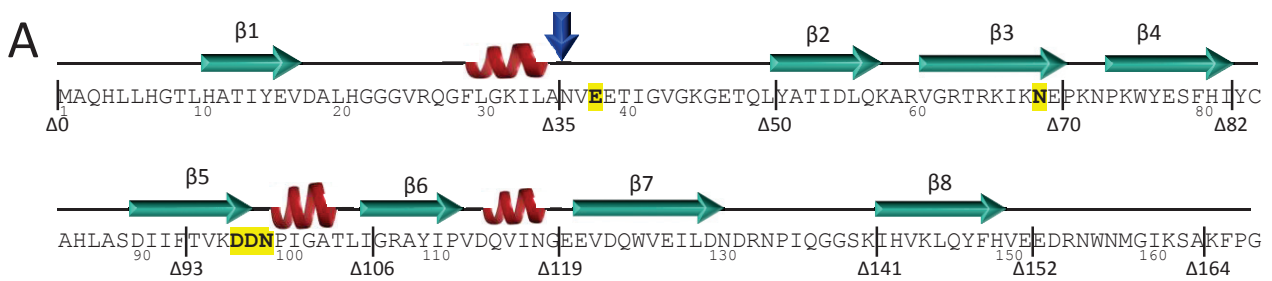


Figure 3 : Expression of AtPLD α minimal domains.

A) Schematic representation of AtPLD α C2 domain. Residues highlighted in yellow represent Ca²⁺ binding residues, red helices represent α -helices and green arrows are β -strands. Positions of minimal domains are indicated by a black vertical line in the peptide sequence. The blue arrow represents the cleavage position found in recombinant protein after purification. B) The PLD activity was measured in crude extracts of *Pichia pastoris* expressing either the wt protein ($\Delta 0$), the empty vector (Ct), or the truncated versions of the enzyme. Activities were calculated relatively to the $\Delta 0$ value. Values are the mean \pm SD obtained from three independent clones ($p < 0.05$ for all constructs compared to $\Delta 0$). The asterisk indicates that the data are represented in part E. C) Validation that the AtPLD α transgene was inserted in the genomic DNA of recombinant clones. After DNA extraction, a PCR was run with primers located on the promoter and on the cDNA 790 bp downstream of the end of the C2 domain coding sequence, note the absence of amplicon in the control (Ct). D) Western-blot analysis of the expression of AtPLD α minimal domains. The blotted bands were immunodetected with a specific AtPLD α C2-domain antibody raised in rabbit, and subsequently visualised using a peroxidase labelled goat anti-rabbit IgG antibody using enhanced chemiluminescence. E) The PLD activity was measured in crude extracts of *Pichia pastoris* expressing either the wt protein ($\Delta 0$), the empty vector (Ct), or the $\Delta 70$ version of the enzyme. Activities were calculated relatively to the $\Delta 0$ value (100%). Results shown on $n = 3$ ($\Delta 0$), $n = 4$ (Ct) or $n = 9$ ($\Delta 70$) independent clones. The horizontal bar represent the mean values. F) Western-blot analysis of the expression of AtPLD α minimal domains. The blotted bands were immunodetected as mentioned above.

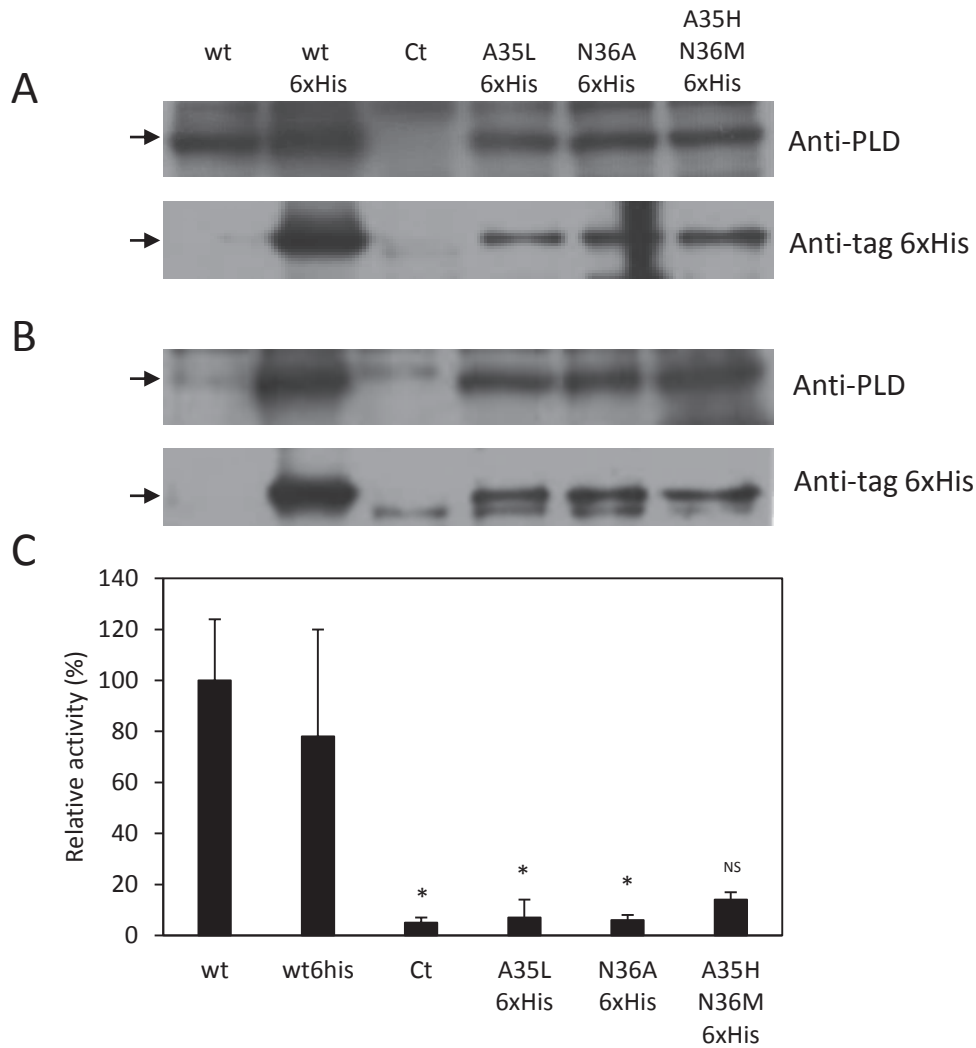


Figure 4 : Western blot analysis of AtPLD α constructs after purification by affinity-chromatography.

The expression was detected in crude protein extracts by immunorevelation of *P. pastoris* clones transformed either with the empty vector (Ct) or expressing the wild-type enzyme (wt), the wild-type enzyme fused with a 6xHis-tag (wt 6xHis) or the different mutants fused with a 6xHis-tag. The blotted bands were immunodetected with either a specific AtPLD α C2-domain antibody (anti-PLD) or an anti-tag 6xHis peroxydase labelled antibody. A) Crude extract fractions. B) Elution fractions after Ni-TED purification. C) The PLD activity was measured in crude extracts of *Pichia pastoris* expressing either the wt protein (wt), the wild-type protein fused with a 6xHis tag (wt 6xHis), the empty vector (Ct), or mutants of the cleavage site. Activities were calculated relatively to the wt value (100%). Values are the mean \pm SD obtained from three independent clones ($p < 0.05$ for all constructs compared to wt 6xHis except A35H N36M 6xHis mutant that is not significant (NS)). The arrow indicates the PLD position at 92.8 kDa.

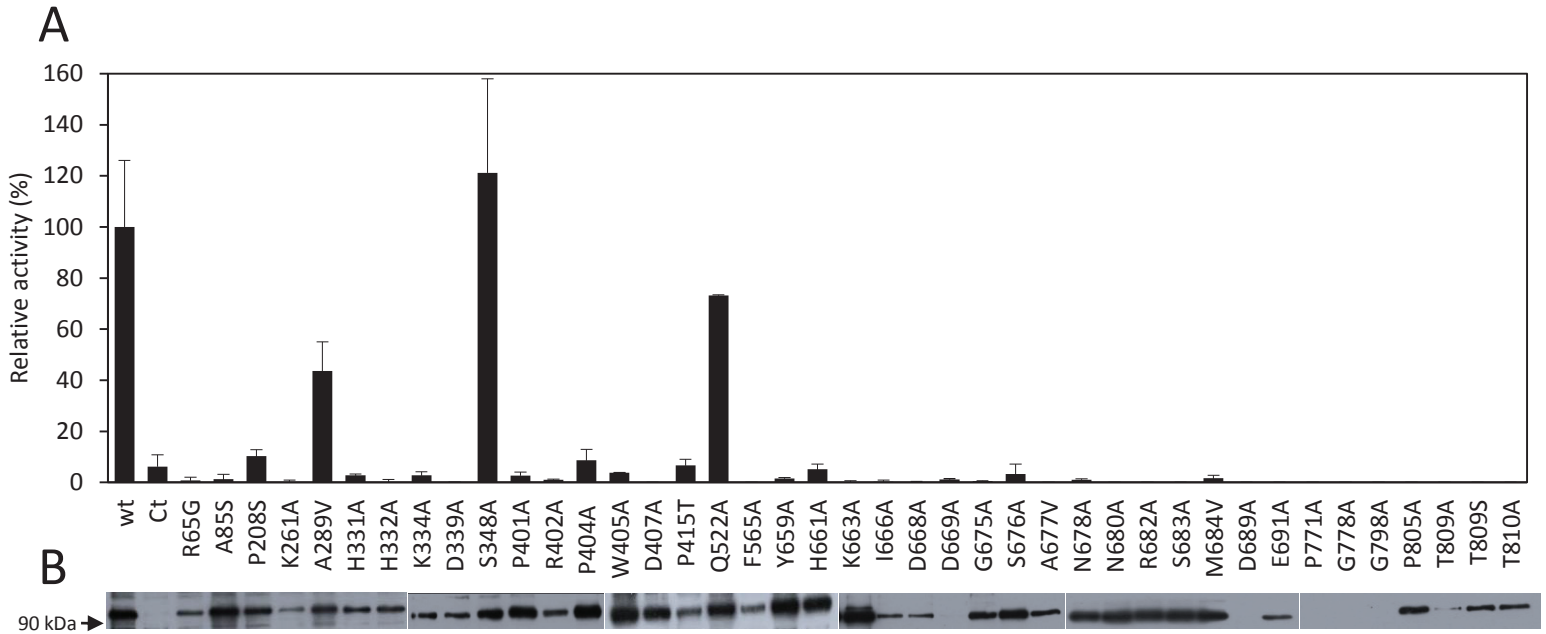


Figure 5 : Relative enzymatic activity and expression of forty-one AtPLD α point mutants.

A) Specific activity was measured with 30 μ g of protein from a crude extract of *P. pastoris* expressing either the wt protein (wt) of a molecular mass of 91,7 kDa, the mutated enzymes or transformed with the empty vector (Ct). Relative activities were then calculated relatively to the wt value (100%). Values are the mean \pm SD obtained from three independent clones ($p < 0.05$ for all constructs compared to wt, except S348A and Q522A mutants).

B) Western-blot analysis of the expression of recombinant AtPLD α mutants. One out of the three clones mentioned above was randomly chosen for SDS-PAGE, the blotted bands were then immunodetected with a specific AtPLD α C2-domain antibody.

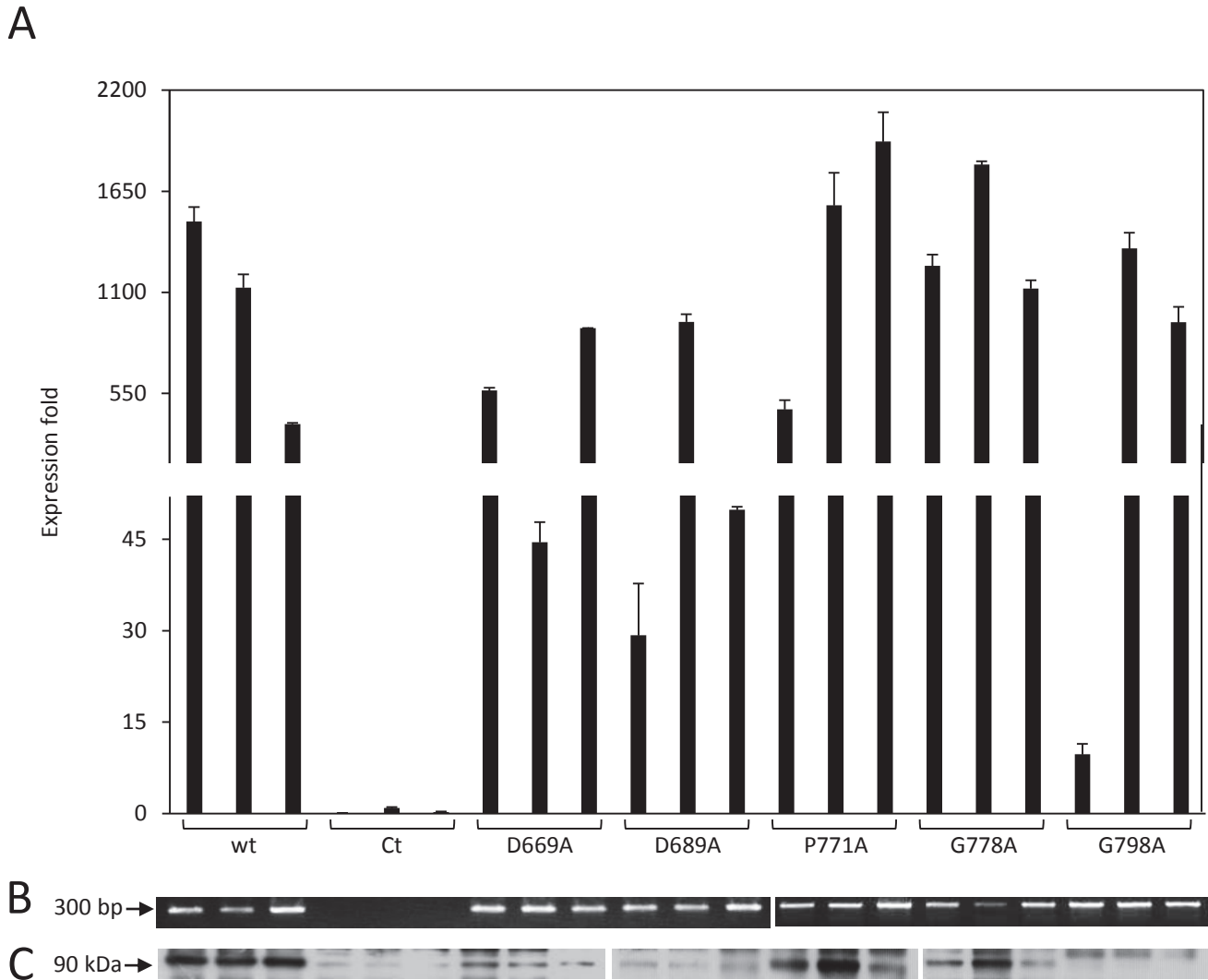


Figure 6 : Expression pattern of *AtPLDα* in different mutants.

A) Relative levels of mRNA from three independent clones expressing either the wt protein (wt), the empty vector (Ct), or the mutated enzyme were determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantification method and *ARG4* mRNA as an internal reference. Values are the mean \pm SD obtained from duplicate samples. B) Validation that the *AtPLDα* transgene was inserted in the genomic DNA of recombinant clones. After DNA extraction, a PCR was run with primers located on the promoter and on the cDNA, note the absence of amplicon in the control (Ct). C) Western-blot analysis of the expression of *AtPLDα* mutants. The blotted bands were immunodetected with a specific *AtPLDα* C2-domain antibody.

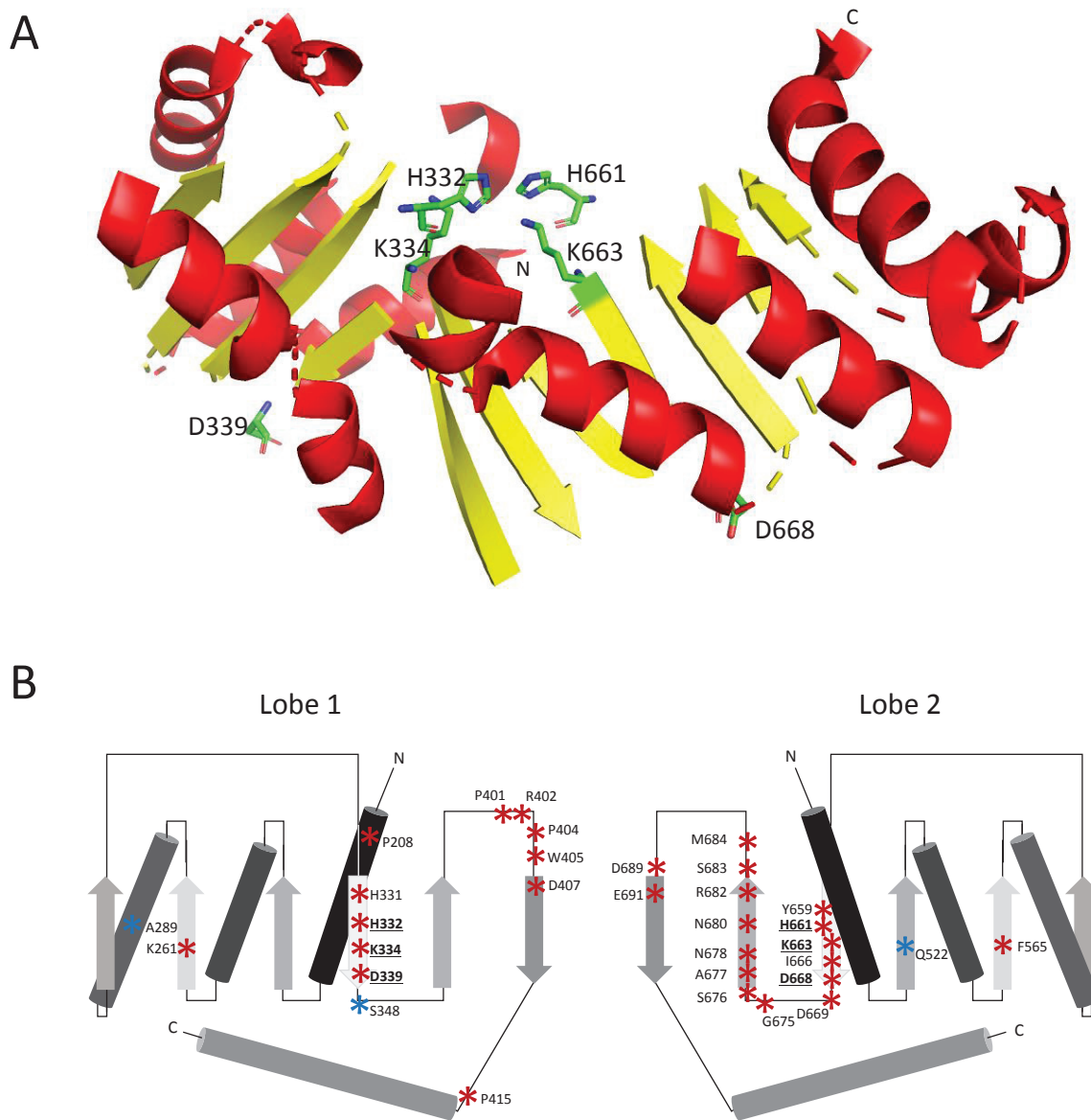


Figure 7: Modelization of AtPLD α .

A) The AtPLD α catalytic core model was built by homology using the Phyre² v2.0 server in intensive mode and was displayed using Pymol v2.0.4, α -helices are represented in red and β -strands in yellow, random coils are not displayed. HKD residues are drawn as sticks. N : N-terminus extremity, C : C-terminus extremity. B) Schematic topology of the AtPLD α catalytic core, cylinders represent the α -helices and arrows represent the β -strands, N : N-terminus extremity, C : C-terminus extremity. Mutations obtained in this study are displayed as stars. Red and blue stars indicate the mutations that affect and do not affect the catalytic activity of the enzyme respectively. HKD catalytic residues are in underlined bold letters.

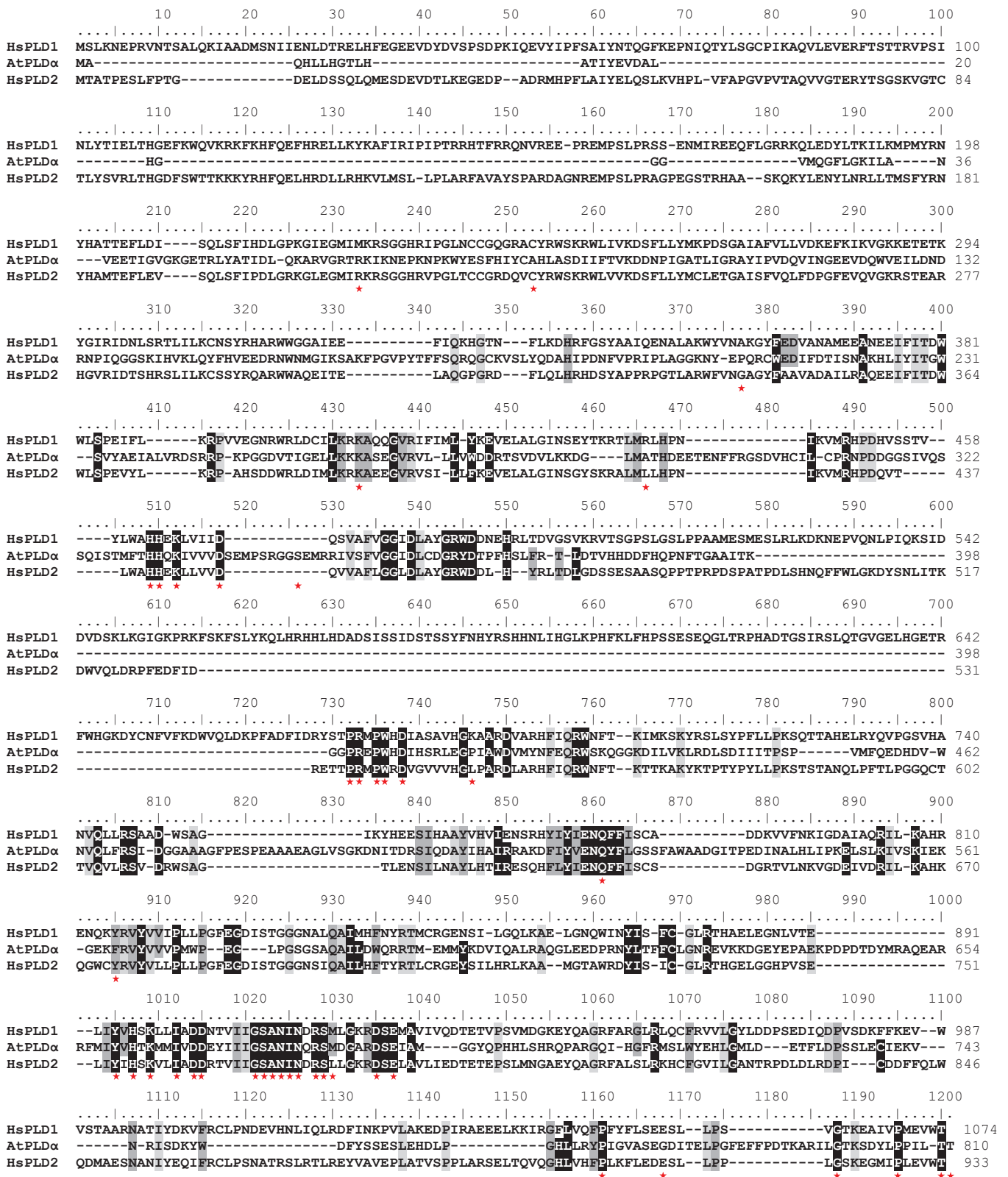


Figure S1 : Alignment of *Homo sapiens* PLD1 and 2 and *Arabidopsis thaliana* PLDα.

Residues highlighted in light grey are identical between HsPLD1, HsPLD2 and AtPLDα. Residues highlighted in dark grey share similar properties between at least three of the four sequences (HsPLD1, HsPLD2 and AtPLDα + plant consensus sequence presented in Figure 1) and are conserved at least at 95 %. Residues highlighted in black share similar properties between at least three of the four sequences (HsPLD1, HsPLD2 and AtPLDα + plant consensus sequence in Figure 1) and are conserved at 100 %. Red stars indicate the mutated residues in AtPLDα.

```

L1 VEEDRNWNMGIKSAKFPVGYTFFSQRQGCKVSLYQDAHIPDNFV-----PRIPLAGGKNYEPQRC
L2 ---D-----HDVWNVQLFRSIDGGAAAGFPESPEAAAEAGLVSGKDNI TDRSI
ss:                                     eeeeeee                eeeehhhhh

L1 WEDIFDTISNAKHLIYITGWSVYAEIALV-----RDSRRPKPGGDVTIGELLKKKASEG--VRVLLLVW
L2 QDAYIHAIIRAKDFIYVENQYFLGSSFAWAADGITPEDINALHLIPKELSLKIVSKIEKGEKFRVYVVVP
ss: hhhhhhhhhhhh eeeeeeeeeee                hhhhhhhhhhhhhh                eeeeeee

L1 DD-----RTSVDVLKKDGLMATHDEETENFFRGSVDH-----CILCP-----RNP
L2 MWPEGLPGSGSAQAILDWQRRTMEMMYKDVIQALRAQGLEEDPRNYLTFFCLGNREVKKDGEYEPAEKPD
ss:                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                eeee

L1 DDGGSIVQSSQISTMFTHHQKIVVVDSEMP SRGGSEMR RIVSFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHH
L2 PD TDYMQAEARRFMIYVHTKMMIVD-----DEYIIIGSANINORSM DGA-----
ss:                eeeeeeeee                eeeeeee

L1 DDFHQPNFTGAAITKGGPREPWHDIHSRLEG-----PIAWDMYNFEQRWSKQGGKDILVKLRD---
L2 -----RD-----SEIAMGGYQPHHLSHRQPARGQIHGFRMSLWYEHLMLETF LDPSSL
ss:                eeeeeee                hhhhhhhhhhhhhh                hhh

L1 -----LSDIIITPSPVMFQE-----
L2 ECIEKVNRI SDKYWDFYSSSESLEHDLPGHLLRYPIGVASEGDITELPGFEFFPDTKARILGTKSDYLPPI
ss:                eeee

L1 ---
L2 LTT
ss:

```

Figure S2: Alignment of lobe 1 (L1) and lobe 2 (L2) of the catalytic core of AtPLD α .

The four motifs I, II, III and IV adapted from [1] are highlighted respectively in yellow, green, red and blue. Prediction of consensus secondary structures (ss) was made using PROMALS3D server, α -helices (h) are indicated in purple and β -strands (e) in grey. Secondary structures of less than four residues and secondary structures where the sequences do not match together are omitted. HKD motifs are in red bold letters and underlined, mutated residues of this work are indicated in red bold letters.

Table S1 : List of the 209 plant PLD α with their database origin and accession number.

Sequence name	Database	ID	Manual correction or assembly
Acer_saccharum	hardwoodgenomics.org	Acer_saccharum_022416_comp49626_c0_seq1_m_25214	
Aegilops_sharonensis	wheat-urgi.versailles.inra.fr	gm TSL_WGS_sharonensis_v1 TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_139175	x
Aegilops_spetoides	wheat-urgi.versailles.inra.fr	gm TGAC_WGS_spetoides_v1 TGAC_WGS_spetoides_v1_contig_201681	x
Aegilops_tauschii	aegilops.wheat.ucdavis.edu	tr N1QSW5 N1QSW5_AEGTAGN=F775_09720PE=3SV=1	
Amaranthus_hypochondriacus	PhytosomeDB	AHYPO_005067-RA	
Amborella_trichopoda	NCBI	tr W1P7V6 W1P7V6_AMBTC_GN=AMTR_s00078p00051300	
Ammopiptanthus_nanus	NCBI	g 1924899158 gb ALC76805_1	
Anacardium_occidentale	PhytosomeDB	Anaac.0007s0838.1	
Ananas_comosus	NCBI	tr A0A199V655 A0A199V655_ANACO	
Anthurium_amicola	Uniprot	tr A0A1D1YKT4 A0A1D1YKT4_9ARAE	
Apostasia_wallichii	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	AUTC018257	
Aquilegia_coerulea	PhytosomeDB	Aqcoe1G164800.1	x
Arabidopsis_halleri	PhytosomeDB	Araha.3034s0021.1	
Arabidopsis_lyrata	NCBI	g 1297853014 ref XP_002894388_1	
Arabidopsis_thaliana			
Arabis_alpina	NCBI	LT669790.1 Arabis_alpina_genome_assembly_chromosome_3	x
Arachis_hypogaea	NCBI	g 188193697 dbj BAE79735_1	
Arachis_duranensis	peanutbase.org	Aradu.F57LG + Aradu.4Q29Q	x
Arachis_ipaensis	peanutbase.org	Araip.MYU90	
Araucaria_cunninghamii	Uniprot	tr A0A0D6RSW2 A0A0D6RSW2_ARACUPE=3SV=1	
Artemisia_annua	plantGDB.org	lc PUT-183a-Artemisia_annua-72809	
Arundo_donax	Uniprot	UniRef90_A0A0A8YCL6_1_823_ReplD=A0A0A8YCL6_ARUDO	
Asparagus_officinalis	NCBI	XP_020251414_1	
Atropa_belladonna	medicinalplantgenomics.msu.edu	aba_locus_4868_iso4_len=2815_ver=2	
Beta_vulgaris	NCBI	g 1731359185 ref XP_010691149_1	
Boechera_stricta	PhytosomeDB	Bostr.28625s0117.1	
Brachypodium_distachyon	NCBI	g 1357135516 ref XP_003569355_1	
Brachypodium_stacei	PhytosomeDB	Brast07G162600.1	
Brassica_junceae_var_junceae	Uniprot	g 1836600657 gb AKM76221_1	
Brassica_napus	NCBI	g 1511261437 gb AGN71005_1	
Brassica_oleracea_var_oleracea	NCBI	g 1922494308 ref XP_013586008_1	
Brassica_rapa	NCBI	g 1685311256 ref XP_009146200_1	
Cajanus_cajan	legumeinfo.org/	C.cajan_00206	

Camelina_sativa	NCBI	gi 727632728 ref XP_010487412_1	
Camptotheca_acuminata	medicinalplantgenomics.msu.edu	caa_locus_4215_iso_1_len_2810_ver_3	
Cannabis_sativa	genome.ccb.utoronto.ca/	C.sativa_Finola.14452338	x
Capsella_rubella	NCBI	gi 565478726 ref XP_006297003_1	
Capsicum_annuum	peppersequence.genomics.cn	Capana03g000439[mRNA]locus=Chr03:6093052:6098122:+	
Carica_papaya	Uniprot	UniRef90_P86387_1_808_ReplID=PLDA1_CARPA	
Castanea_mollissima	hardwoodgenomics.org	snap_masked-scaffold01907-abinit-gene-0.8-mRNA-1	
Catharanthus_roseus	medicinalplantgenomics.msu.edu	cra_locus_3139_iso_5_len_2876_ver_3	
Cephalotus_follicularis	Uniprot	tr A0A1Q3D418 A0A1Q3D418_CEPFO	
Chenopodium_quinoa	quinoa.kazusa.or.jp	Cqu_c06370.1_g015.1 + Cqu_c02403.1_g011.1	x
Chorispora_bungeana	NCBI	gi 544371640 gb AGW22212_1	
Cicer_arietinum	Legumeinfo.org	cicar.LCC4958.Ca_26353	
Citrus_clementina	NCBI	gi 567869291 ref XP_006427267_1	
Citrus_sinensis	NCBI	gi 572152911 ref INP_001275827_1	
Citrullus_lanatus	icugi.org	Cla012712[mRNA]locus=Chr7:25591925:25595879:+	x
Coccomyxa_subellipsoidea	This work		
Cocos_nucifera	NCBI	gi 595088676 gb AHN53202_1	
Coffea_canephora	Uniprot	UniRef90_A0A068UQ75_1_807_ReplID=A0A068UQ75_COFCA	
Corchorus_olitorius	Uniprot	tr A0A1R3I2Z8 A0A1R3I2Z8_9ROSI	
Craterostigma_plantagineum	NCBI	gi 4867805 emb CAB43063_1	
Cucumis_melo	NCBI	gi 1035419752 ref XP_016902674_1	
Cucumis_sativus	NCBI	gi 821595250 ref INP_001295822_1	
Cymbidium_ensifolium	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	CETC003830	
Cynara_cardunculus	Uniprot	gi 66346964 emb CAE47482_2	
Cypripedium_formosanum	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	CFTC026961	
Daucus_carota_subsp._sativus	Uniprot	gi 1040886372 ref XP_01725229_1	
Dendrobium_catenatum	NCBI	XP_020690475.1	
Dianthus_caryophyllus	carnation.kazusa.or.jp	Dca4072.1 3-exons f-1 sp G9XFX8	x
Dichantheium_oligosanthes	Uniprot	tr A0A1E5VEW5 A0A1E5VEW5_9POAL	
Digitalis_purpurea	medicinalplantgenomics.msu.edu	dpa_locus_4646_iso_1_len_2263_ver_4 + dpa_locus_3734_iso_2_len_2263_ver_1	x
Dimocarpus_iongan	NCBI	gi 325071291 gb ADY75750_1	
Dioscorea_villosa	medicinalplantgenomics.msu.edu	dva_locus_4199_iso_2_len_1330_ver_2 + dva_locus_57205_iso_1_len_1294_ver_2	x
Elaeis_guineensis	NCBI	gi 743875176 ref XP_010907270_1	
Erycina_pusilla	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	EPTC011289	

Erythranthe_guttata	Uniprot	gi 848918374 ref XP_012856438_1	
Eucalyptus_grandis	NCBI	gi 702380459 ref XP_010063458_1	
Eutrema_salsugineum	NCBI	gi 567198686 ref XP_006406922_1	
Fagopyrum_esculentum	buckwheat.kazusa.or.jp	Fes_sc0000017.1.g000012.aaa.1/f	
Fagus_sylvatica	plantGDB.org	ic PUT-181a-Fagus_sylvatica-13386	
Fragaria_linumae	strawberry-garden.kazusa.or.jp	Fl_iscf00000135.1.g00001.1	
Fragaria_nubicola	strawberry-garden.kazusa.or.jp	FNU_iscf00043984.1.g00001.1	
Fragaria_vesca_subsp_vesca	NCBI	gi 470134985 ref XP_004303313_1	
Fragaria_X_ananassa	Uniprot	gi 58891689 gb AAW83125_1	
Fraxinus_pennsylvanica	hardwoodgenomics.org	Fraxinus_pennsylvanica_120313_comp59847_c0_seq1_m.32547	
Gastrodia_elata	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	GETC008602	
Genlisea_aurea	Uniprot	UniRef90_58DR53_1_808_ReplID=58DR53_9LAMI	
Ginkgo_biloba	medicinalplantgenomics.msu.edu	gba_locus_138_iso_5_len_3065_ver_2	x
Gleditsia_triacanthos	hardwoodgenomics.org	Gleditsia_triacanthos_082614_comp26423_c0_seq1	
Glycine_max	NCBI	gi 356519347 ref XP_003528334_1	
Gossypium_arboreum	NCBI	gi 196166539 gb ACG70840_1	
Gossypium_hirsutum	NCBI	gi 1031986117 ref NP_001314029_1	
Gossypium_raimondii	NCBI	gi 823278207 ref NP_001296279_1	
Hevea_brasiliensis	RubberTreeGenomeSearch	isotig02.286 + isotig04982	x
Helianthus_annuus	NCBI	XP_021989082.1	
Herrania_umbatica	NCBI	XP_021298177.1	
Hordeum_vulgare_subsp_vulgare	plantgdb.org	gi 151418359 gb AK249711.1	
Ipomoea_trifida	sweetpotato-garden.kazusa.or.jp	ltr_sc000547.1.g00011.1	x
Ipomoea_nil	NCBI	XP_019179058_1	
Jatropha_curcas	NCBI	gi 806776585 ref NP_001292934_1	
Juglans_regia	NCBI	XP_018851707_1	
Kalanchoe_fedtschenkoi	PhytosomeDB	Kaladp0037s0351.1	
Kalanchoe_laxiflora	PhytozomeDB	Kalax.0860s0008.1	
Lactuca_sativa_Letassy	plantGDB.org	gi 329673138 gb J1575644.1	
Lactuca_seriola_Serrassy	plantGDB.org	gi 340631698 gb J0022425.1	
Leersia_perrieri	Uniprot	UniRef90_A0A0D9WDB2_1_821_ReplID=A0A0D9WDB2_90RYZ	
Lindenbergia_philippensis	ppgp.huck.psu.edu/	LPHGnb1_18378	
Linum_usitatissimum	PhytosomeDB	Lus10041787	
Liquidambar_styraciflua	hardwoodgenomics.org	Liquidambar_styraciflua_01052015_comp40985_c0_seq1_m.23207	

Liriodendron_tulipifera	hardwoodgenomics.org	Liriodendron_tulipifera_10132014_comp25478_c0_seq1_m.35846	
Litchi_chinensis	NCBI	gi 310780853 gb ADP23922_1	
Lolium_temulentum	NCBI	gi 237637581 gb ABX83202_2	
Lotus_japonica	kazusa.or.jp/lotus/	lj0g3v0116389.1	
Lupinus_angustifolius	NCBI	tr A0A1J7G7Y5 A0A1J7G7Y5_LUPAN	
Malus_domestica	NCBI	gi 658049276 ref XP_008360327_1	
Manihot_esculenta	PhytozomeDB	Manes.04G113900.1	
Marchantia_polymorpha	phytozomeDB	Mapo y0037s0125.1	
Medicago_truncatula	NCBI	gi 922362120 ref XP_003604419_2	
Mimulus_guttatus	phytozomeDB	Migut.D01066.1	
Momordica_charantia	NCBI	XP_022146987.1	
Morus_notabilis	NCBI	gi 703101603 ref XP_010097235_1	
Musa_acuminata_subsp_malaccensis	NCBI	gi 695068352 ref XP_009381115_1	
Neulumbo_nucifera	NCBI	gi 719995169 ref XP_010254402_1	x
Neuwiedia_zollingeri	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	NZTC007677	
Nicotiana_attenuata	NCBI	XP_019229753_1	
Nicotiana_benthiana	NCBI	gi 926458000 dbj BAS29955_1	
Nicotiana_sylvestris	NCBI	gi 698509392 ref XP_009799916_1	
Nicotiana_tabacum	NCBI	gi 1027859736 ref NP_001312217_1	
Nicotiana_tomentosiformis	NCBI	gi 697143152 ref XP_009625689_1	
Noccaea_caerulescens	Uniprot	tr A0A1J3CX52 A0A1J3CX52_NOCCA	
Nyssa_sylvatica	hardwoodgenomics.org	Nyssa_sylvatica_10132014_comp26876_c0_seq2_m.12186	
Ophrys_sphagodes	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	OSTC013733	
Orchis_italica	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	OITC005672	
Orobanchae_egyptiaca	ppgp.huck.psu.edu/	OrAe0GB1_43359	
Oropetium_thomaeum	PhytozomeDB	Oropetium_20150105_07247A	
Oryza_barthii	gramene.org	tr A0A0D3EK51 A0A0D3EK51_9ORYZ	
Oryza_brachyantha	NCBI	gi 573912199 ref XP_006643814_1	
Oryza_glaberrima	gramene.org	tr 11NKP2 11NKP2_ORYGL	
Oryza_glumipatula	Uniprot	tr A0A0D9Y3X6 A0A0D9Y3X6_9ORYZ	x
Oryza_meridionalis	gramene.org	tr A0A0E0DMQ1 A0A0E0DMQ1_9ORYZPE=3SV=1	
Oryza_nivara	gramene.org	tr A0A0E0FGW9 A0A0E0FGW9_ORYNIPE=3SV=1	
Oryza_punctata	plants.ensembl.org	1dna:chromosomeAVC100000000:1:3170000:3180000:1:	x
Oryza_rufipogon	gramene.org	tr A0A0E0MS02 A0A0E0MS02_ORYRUPE=3SV=1	

Onyza_sativa_japonica_Group	NCBI	gi 1002229990 ref XP_015646609_1	
Panax_quinquefolius	medicinalplantgenomics.msu.edu	pqa_locus_2945_iso_5_len_2963_ver_2	
Panicum_hallii	PhytozomeDB	Pahal.E04146.1	
Panicum_virgatum	PhytozomeDB	Pavir.J37463.1	
Papaver_somniferum	Uniprot	UniRef90_Q8W1B2_1_813_ReplID=Q8W1B2_PAPSO	
Petunia_inflata	solgenomics.net	Peinf101Scf01889g07027.1	
Petunia_axillaris	solgenomics.net	Peaxi162Scf00207g00635.1	
Phalaenopsis_aphrodite	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	PATC152710	
Phalaenopsis_bellina	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	PBTC021795	
Phalaenopsis_equestris	NCBI	XP_020572452.1	
Phalaenopsis_lueddemanniana	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	PLTC002313	
Phalaenopsis_modesta	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	PMTC011286	
Phalaenopsis_schilleriana	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw	PSTC003310	
Phaseolus_angularis	Uniprot	tr A0A0L9T9K9 A0A0L9T9K9_PHAANGN=LR48_Vigan406s011000PE=3SV=1	
Phaseolus_vulgaris	NCBI	gi 593267134 ref XP_007135745_1	
Phoenix_dactylifera	NCBI	gi 672136660 ref XP_008792037_1	
Physcomitrella_patens	NCBI	gi 168020824 ref XP_001762942_1	
Picea_sitchensis	congenie.org	lc PUT-183a-Picea_sitchensis-25803 + 14430 + 23691	x
Pimpinella_brachycarpa	NCBI	cdNA U96438.1	x
Pinus_taeda	congenie.org	lc scaffold11357.1	x
Populus_deltoides	PhytozomeDB	Podel.03GD040800.1	
Populus_euphratica	NCBI	gi 743928492 ref XP_011008453_1	
Populus_trichocarpa	NCBI	gi 566160536 ref XP_006385316_1	
Prunus_avium	NCBI	XP_021806419.1	
Prunus_mume	NCBI	gi 645277360 ref XP_008243733_1	
Prunus_persica	NCBI	gi 595963988 ref XP_007217042_1	
Pyrus_x_bretschneideri	NCBI	gi 694443469 ref XP_009348321_1	
Quercus_rubra	hardwoodgenomics.org	Quercus_rubra_120313_comp31539_c0_seq2_m.33063	x
Raphanus_sativus	radish.kazusa.or.jp	Rsa1.0_01316.1_g00008.1	
Rauvolfia_serpentina	medicinalplantgenomics.msu.edu	rsa_locus_2363_iso_8_len_2796_ver_2	
Rhinolophus_sinicus	NCBI	XP_019575908.1	
Ricinus_communis	NCBI	gi 1021312158 ref NP_001310687_1	
Rosmarinus_officinalis	medicinalplantgenomics.msu.edu	roa_locus_19353_iso_7_len_2904_ver_2	
Salix_purpurea	PhytozomeDB	SapurV1A.1759s0050.1	

Selaginella_moellendorffii	Uniprot		UniRef90_D8R9X4_1_810_RepID=D8R9X4_SELML
Sesamum_indicum	NCBI		g 747054459 ref XP_011073437_1
Setaria_italica	NCBI		g 526117421 ref INP_001267764_1
Setaria_viridis	PhytozomeDB		Sevir:9G383500.1
Silene_vulgaris	silengenomics.biology.virginia.edu		ic iso tig30216gene=isogroup10418length=2559numContigs=1
Solanum_lycopersicum	NCBI		g 13111655 gb AAG45485_1
Solanum_melongena	eggplant.kazusa.or.jp		Sme2_5_00018_1_g00030_1
Solanum_pennellii	NCBI		g 970035852 ref XP_015079263_1
Solanum_peruvianum	solgenomics.net		a10339
Solanum_pimpinellifolium	solgenomics.net		Sopim06g068090
Solanum_tuberosum	NCBI		g 565379597 ref XP_006356207_1
Sorghum_bicolor	NCBI		g 242086400 ref XP_002443625_1
Sphagnum_fallax	PhytozomeDB		Sphfalx0019s0052.1
Spinacia_oleracea	genomevolution.org		Sp_062600_owsz.t1
Spirodela_polyrhiza	PhytozomeDB		Spipo0G0089800
Striga_hermanthica	ppgp.huck.psu.edu/		SHe61FB1_1094
Tarenaya_hassleriana	NCBI		g 729360056 ref XP_010545768_1
Theobroma_cacao	NCBI		g 590615267 ref XP_007023175_1
Trifolium_pratense	PhytozomeDB		Tp57577_TGAC_v2_mRNA39968
trifolium_subterraneum	clovergarden.jp		Tsud_chr6.g02240.1.am.mkhc.1631588..1635259-
Triphysaria_pusilla	ppgp.huck.psu.edu/		TrPuRnBC1_17902+16471+14731+4777
Triphysaria_versicolor	ppgp.huck.psu.edu/		TVe8C1_252
Triticum_aestivum	plantgdb.org		g 32128813 gb BT009262.1
Triticum_durum	wheat-urgi.versailles.inra.fr		gn TGAC_WGS_durum_v1 TGAC_WGS_durum_v1_contig_2585141
Triticum_monococcum	wheat-urgi.versailles.inra.fr		gn TGAC_WGS_monococcum_v1 TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_915199
Triticum_turgidum	wheat.pw.usda.gov		UCW_Tt-k41_contig_5877predictedORF(type 'full_length')based_on_protein_gn BL_ORD_ID 4120'_from_relative_'bd';_masked_based_on_gn TREP TREP1650
Triticum_urartu	wheat.pw.usda.gov		UCW_Tu-k35_contig_15predictedORF(type 'full_length')based_on_protein_gn BL_ORD_ID 9175'_from_relative_'bd'
Valeriana_officinalis	medicinalplantgenomics.msu.edu		voa_locus_7531_iso_8_len_1120_ver_2 + voa_locus_7973_iso_2_len_2473_ver_2 + voa_locus_7984_iso_1_len_713_ver_2
Vanilla_planifolia	orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw		VPTC011653
Vigna_angularis	NCBI		tr AA0A053T0K0 AA0A053T0K0_PHAANGN=Vigan_09G223400PE=3SV=1
Vigna_radiata_var_radiata	NCBI		g 951035742 ref XP_014516428_1
Vigna_unguiculata	NCBI		g 1928979 gb AA851392_1
Vitis_vinifera	NCBI		g 951311832 gb ALN66065_1
Wollemia_nobilis	Uniprot		UniRef90_AA0A0C9RUI2_1_812_RepID=AA0A0C9RUI2_9SPER

Zea_mays	NCBI	gi 670428155 ref XP_008654846_1	
Ziziphus_jujuba	NCBI	gi 1009112854 ref XP_015870462_1	
Zostera_marina	PhytozomeDB	Zosma4g01770.1	
Zoysia_japonica_nagirizaki	zoysia.kazusa.or.jp	Zjn_sc00011.1.g05600.1.sm.mkhc 2711587..2715900 -	
Zoysia_matrella_wakaba	zoysia.kazusa.or.jp	Zmw_sc00159.1.g00070.1.sm.mkhc 14962..19209 -	
Zoysia_pacifica_zanpa	zoysia.kazusa.or.jp	Zpz_sc00039.1.g00690.1.sm.mkhc 322287..326530 +	

Table S2. List of primers used.

Restriction sites are underlined, start and stop codons are in bold, mutations are in red and italicized.

Primer name	Target	Sequence 5'→3'
21	Promotor T7	TTAATACGACTCACTATAGG
29	Promotor pGAP	GGAAACCACCAGAATCG
55	Terminator pGAP	GGCAAATGGCATTCTGACAT
97	AtPLD Rev	TGCT <u>GCGGCCGCTT</u> AGGTTGTAAGGATTGGAG
102	AtPLD Rev	TAGTTCTTCCCTCCAGC
113	AtPLD Rev	CCTGAATCACATCCTTGTAC
222	AtPLD Fwd	CTGGTACCGCGGAC ATG TTGCACCATCACCATCACCATATG GCGCAGCATCTGTTGC
225	AtPLD H661A Fwd	ATGATTTACGTC GCC ACCAAATGATG
226	AtPLD H661A Rev	CATCATTTTGGTG GCG ACGTAAATCAT
227	AtPLD K663A Fwd	TACGTCCACACC GCA ATGATGATCGTT
228	AtPLD K663A Rev	AACGATCATCATT GCG GTGTGGACGTA
229	AtPLD D668A Fwd	ATGATGATCGTTG CCG ATGAATACATT
230	AtPLD D668A Rev	AATGTATTCATCG GCA ACGATCATCAT
231	AtPLD N678A Fwd	ATTGGGTCTGCT GCC CATCAACCAGAGG
232	AtPLD N678A Rev	CCTCTGGTTGATG GCG AGCAGACCCAAT
241	AtPLD NΔ0 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG GCGCAGCATCTG
242	AtPLD NΔ35 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG AATGTAGAAGAGACGATTGTT
243	AtPLD NΔ50 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG TATGCGACGATTGATCTG
244	AtPLD NΔ70 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG CCTAAGAACCCAAAGTGG
245	AtPLD NΔ152 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG GAGGATCGTAACTGGAAC
246	AtPLD NΔ164 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG AAGTTCCTGGAGTGCCA
261	AtPLD 6his A35L Rev	CTCTTCTACATTT AGC CAGAATCTTGCC
262	AtPLD 6his N36A Fwd	AAGATTCTGGCA GCT GTAGAAGAGACG
263	AtPLD 6his N36A Rev	CGTCTTCTACAG GCT GCCAGAATCTT
266	AtPLD S676A Fwd	ATTATCATTGGG GCT GCTAACATCAAC

267	AtPLD S676A Rev	GTTGATGTTAGCAGCCCCAATGATAAT
268	AtPLD H332A Fwd	ATGTTACACGCATGCTCAGAAAATCGTT
269	AtPLD H332A Rev	AACGATTTTCTGAGCATGCGTGAACAT
270	AtPLD K334A Fwd	ACGCATCATCAGGCAATCGTTGTTGTG
271	AtPLD K334A Rev	CACAACAACGATTGCCTGATGATGCGT
273	AtPLD D339A Rev	TGGCATCTCGCTGGCCACAACAACGAT
274	AtPLD S348A Fwd	AGCAGAGGAGGAGCAGAAATGAGGAGA
275	AtPLD S348A Rev	TCTCCTCATTCTGCTCCTCCTCTGCT
277	AtPLD 6his A35H/N36M Fwd	GGCAAGATTCTGCATATGTAGAAGAGACG
278	AtPLD 6his A35H/N36M Rev	CGTCTCTTCTACCATATGCAGAATCTTGCC
279	AtPLD Q522A Fwd	TACGTTGAAAACGCGTACTTCCTTGGG
280	AtPLD Q522A Rev	CCCAAGGAAGTACGCGTTTTCAACGTA
281	AtPLD H331A Fwd	ACTATGTTACGCTCATCAGAAAATC
282	AtPLD H331A Rev	GATTTTCTGATGAGCCGTGAACATAGT
283	AtPLD D669A Fwd	ATGATCGTTGACGCTGAATACATTATC
284	AtPLD D669A Rev	GATAATGTATTCA GCGTCAACGATCAT
285	AtPLD I666A Fwd	ACCAAAATGATGGCTGTTGACGATGAA
286	AtPLD I666A Rev	TTCATCGTCAACAGCCATCATTTTGGT
287	AtPLD Y659A Fwd	CGTTTCATGATTGCCGTCCACACAAA
288	AtPLD Y659A Rev	TTTGGTGTGGACGGCAATCATGAAACG
304	AtPLD P401A Fwd	AAAGGTGGTGCAAGGGAGCCT
305	AtPLD P401A Rev	AGGCTCCCTTG CACCACCTTT
306	AtPLD R402A Fwd	GGTGGTCCA GCGGAGCCTTGG
307	AtPLD R402A Rev	CCAAGGCTCCGCTGGACCACC
308	AtPLD P404A Fwd	CCAAGGGAGGCTTGGCATGAC
309	AtPLD P404A Rev	GTCATGCCAAGCCTCCCTTGG
310	AtPLD W405A Fwd	AGGGAGCCTGCGCATGACATT
311	AtPLD W405A Rev	AATGTCATGCGCAGGCTCCCT
312	AtPLD D407A Fwd	CCTTGGCATGCCATTCACTCC
313	AtPLD D407A Rev	GGAGTGAATGGCATGCCAAGG
314	AtPLD G675A Fwd	ATTATCATTGCGTCTGCTAAC

315	AtPLD G675A Rev	GTTAGCAGACGCAATGATAAT
316	AtPLD A677V Fwd	ATTGGGTCTGTTAACATCAAC
317	AtPLD A677V Rev	GTTGATGTTAACAGACCCAAT
318	AtPLD N680A Fwd	GCTAACATCGCCAGAGGTCA
319	AtPLD N680A Rev	TGACCTCTGGGCGATGTTAGC
320	AtPLD R682A Fwd	ATCAACCAGCGTCAATGGAC
321	AtPLD R682A Rev	GTCCATTGACGCCTGGTTGAT
322	AtPLD S683A Fwd	AACCAGAGGGCAATGGACGGT
323	AtPLD S683A Rev	ACCGTCCATTGCCCTCTGGTT
324	AtPLD D339A Fwd	GTTGTGGCCAGCGAGATGCCA
325	AtPLD 6his A35L Fwd	ATTCTGCTAAATGTAGAA
328	AtPLD P771A Fwd	CTCCGCTACGCGATCGGTGTA
329	AtPLD P771A Rev	TACACCGATCGCGTAGCGGAG
330	AtPLD G778A Fwd	GCCAGCGAAGCCGACATCACT
331	AtPLD G778A Rev	AGTGATGTGCGCTTCGCTGGC
332	AtPLD G798A Fwd	CGTATCCTCGCCACCAAATCA
333	AtPLD G798A Rev	TGATTTGGTGCGGAGGATACG
336	AtPLD K261A Fwd	CTCAAGAAGCGGGCTAGTGAA
337	AtPLD K261A Rev	TTCACTAGCCGCCTTCTTGAG
359	AtPLD P805A Fwd	GACTACCTGGCTCCAATCCTT
360	AtPLD P805A Rev	AAGGATTGGAGCCAGGTAGTC
363	AtPLD T809A Fwd	CCAATCCTTGCAACCTAAGCG
364	AtPLD T809A Rev	CGCTTAGGTTGCAAGGATTGG
365	AtPLD T809S Fwd	CCAATCCTT7CAACCTAAGCG
366	AtPLD T809A Rev	CGCTTAGGTTGAAAGGATTGG
367	AtPLD T810A Fwd	ATCCTTACAGCCTAAGCGGCC
368	AtPLD T810A Rev	GGCCGCTTAGGCTGTAAGGAT
369	Promotor SP6	CATTTAGGTGACACTATAG
387	AtPLD Rev	AAAAGAACCCTGACACCTT
397	AtPLD D689A Fwd	GGTGCAAGAGCCTCTGAGATA
398	AtPLD D689A Rev	TATCTCAGAGGCTCTTGCACC

399	AtPLD E691A Fwd	AGAGACTCTG CG GATAGCAATG
400	AtPLD E691A Rev	CATTGCTATC GC CAGAGTCTCT
401	AtPLD F565A Fwd	GGAGAGAAG GCC CAGGGTCTAT
402	AtPLD F565A Rev	ATAGACCCTG GC CTTCTCTCC
405	AtPLD NΔ82 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG ATTTACTGTGCTCACTTGG
406	AtPLD NΔ93 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG ACTGTTAAAGATGATAATCCC
407	AtPLD NΔ106 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG GGGAAGAGCTTACATTCCT
408	AtPLD NΔ119 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG GAGGAAGTGGATCAGTG
409	AtPLD NΔ141 Fwd	GGTAC <u>CCGCGG</u> ATG ATTCATGTCAAGCTTCAATATTT

Article 2

Arhab, Y., Rahier, R., Noiriél, A., Cherrier, M.V., and Abousalham, A. (2018).

Expression and Purification of Recombinant *Vigna unguiculata* Phospholipase D in *Pichia pastoris* for Structural Studies.

[Methods Mol Biol.](#) 2018;1835:191-201. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_10.



Expression and Purification of Recombinant *Vigna unguiculata* Phospholipase D in *Pichia pastoris* for Structural Studies

Yani Arhab, Renaud Rahier, Alexandre Noiriel, Mickael V. Cherrier, and Abdelkarim Abousalham

Abstract

The production of pure enzymes in high quantities is a proven strategy to study the catalytic mechanism as well as the solving of structure at the atomic scale for therapeutic or industrial purposes. Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4) is found in a wide majority of living organisms and has been shown to be involved in signal transduction, vesicle trafficking, and membrane metabolism processes. Located at the membrane-cytoplasm interface, plant PLDs are soluble but also bear an evident hydrophobic aspect making challenging its expression and its purification in large quantity. So far there is no high-resolution three-dimensional structure for a eukaryotic PLD. The protocols herein describe the cloning of the eukaryotic recombinant PLD α of *Vigna unguiculata* (cowpea) into the yeast expression system *Pichia pastoris* and its two-step purification process. This allowed us to purify to homogeneity hundreds of micrograms of highly pure protein to conduct *in fine* structural studies.

Key words Oeryl-Sepharose, pGAPZB vector, Phospholipase D, *Pichia pastoris*, *Vigna unguiculata*

1 Introduction

Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4) is an ubiquitous enzyme which hydrolyzes the distal phosphodiester bond of glycerophospholipids, leading to the formation of phosphatidic acid (PA) and a free polar head group. PA is an important second messenger involved in cellular processes such as cell proliferation and surviving, vesicular formation, and trafficking [1] but also transcription and NADPH oxidase activation [2]. Therefore, PLD is, through its end-product PA, indirectly implicated in diseases like cancers, multiple sclerosis, or Alzheimer disease [2]. This means that PLD is, today, a genuine therapeutic target. In addition, PLD catalyzes the transfer of the phosphatidyl group of glycerophospholipids on a primary alcohol promoting the potential to produce new

phospholipids for industrial purposes [3]. These specific catalytic characteristics are underlying the necessity to purify and study such an enzyme for both therapeutic and industrial interests.

Various forms of PLD have been cloned and identified in plants that differ in their catalytic properties and regulatory processes [2]. The main form, PLD α , is active *in vitro* at millimolar Ca^{2+} concentrations and is phosphoinositide independent [4]. PLD β , PLD γ , and PLD δ , which are the most active forms *in vitro*, require all the presence of phosphoinositide serving as a cofactor and necessitate micromolar Ca^{2+} concentrations [5].

The study of plant PLD is the finest way to investigate these widespread enzymes as they are the only eukaryotic PLD to date to be purified to homogeneity at high quantities [2]. If PLD has been first described in 1947 by Hanahan and Chaikoff [6] in carrot, purification has been conducted successively using cabbage [7], castor bean [8], soy bean [9], sunflower [10], and mustard seed [11]. At the same time, the genes have been cloned from castor bean, rice, maize, cabbage, and *Arabidopsis thaliana* and then expressed in *Escherichia coli* [12–16]. The *Vigna unguiculata* PLD has been produced in insect cells [17] and in the yeast expression system *Pichia pastoris* [18] as for *Arabidopsis thaliana* [19]. For most of these purifications, the protocol established by Lambrecht and Ulbrich-Hofman [20] in 1992 has been used. It describes a single-step purification using a Ca^{2+} -dependent hydrophobic interaction chromatography. Based on the Ca^{2+} dependency of plant PLD, the protocol uses oeryl-Sepharose resin to specifically bind PLDs in the presence of Ca^{2+} .

Despite all these efforts to purify plant PLDs, there is no known three-dimensional (3D) structure yet of eukaryotic PLDs. In 2000, Leiros et al. [21] solved the 3D structure of the *Streptomyces* sp. (strain PMF) PLD (Protein Database (PDB) code: 1F01) which led to the first insight into the structure of the so-called “HKD” catalytic domains with histidine (H), lysine (K), and aspartic acid (D) described in 1996 as essential amino acid residues for full catalytic activity of PLD [22]. This structure describes a polypeptide chain composed of two similar domains each one bearing an HKD motif facing each other at the interface of these domains. Supporting these results the structure of the *Streptomyces antibioticus* PLD (PDB code: 2ZE4) has been released few years later (2007, data unpublished). For eukaryotic PLD, the structure of *Loxosceles intermedia* venom PLD [23] has been solved (PDB code: 3RLH), but this enzyme does not belong to the HKD-PLD subtype. Crystals of *Vigna unguiculata* PLD α has been obtained in 2001 [24], but no 3D structure has been solved neither by molecular replacement nor by anomalous dispersion methods. Finally, a SAXS (Small-Angle X-ray Scattering) envelope of cabbage PLD [25] describes a barrel-shaped monomer with loose ends at both extremities.

Here we describe the protocol for the expression and purification of the recombinant *Vigna unguiculata* PLD α produced in the yeast *Pichia pastoris* by performing Ca²⁺-dependent hydrophobic interaction chromatography and gel filtration chromatography to conduct structural studies.

2 Materials

2.1 Cloning and Expression

1. DNA encoding the PLD α from *Vigna unguiculata* in the pVLI392 vector.
2. Forward (5'-CCTGAATTCCGCATGGCGCAAAATTCTGC TTC-3') and reverse (5'-AGTCTAGACCATGCTATGCC TAAC-3') primers.
3. *Pfu* DNA polymerase.
4. Thermocycler for polymerase chain reaction (PCR).
5. pGAPZB vector (Invitrogen) containing the alcohol oxidase promoter AOX1 and the Zeocin marker.
6. Wizard DNA purification system (Promega).
7. Wild-type *Pichia pastoris* X33 strain (Invitrogen).
8. Zeocin stock solution: 100 mg/mL in sterilized water.
9. Low-salt lysogeny broth (LB) medium (10 g tryptone, 5 g NaCl, 5 g yeast extract).
10. DH5 α *Escherichia coli* competent cells.
11. T4 DNA ligase.
12. 1% Agarose gel containing ethidium bromide.
13. Agarose gel electrophoresis device.
14. Tris-EDTA (Tris(hydroxymethyl)aminomethane-ethylenediaminetetraacetic acid) buffer solution: 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, and pH 8.
15. Zymolyase stock solution: 100 mg/mL in sterilized water.
16. 100 \times 15 mm sterile Petri dishes.
17. 1 M sorbitol.
18. YPD (yeast extract peptone dextrose) medium containing 20 g Bacto Peptone, 20 g D-glucose, buffered with 10 mM sodium phosphate which pH was initially adjusted to 6.8.
19. YPD plates for solid cell cultures (2% agar, w/v, in YPD medium) containing Zeocin (100 μ g/mL).
20. Electroporation system.

2.2 Purification of Recombinant PLD α

21. EcoRI, XbaI, and AvrII restriction enzymes.
22. Probe-type sonicator.
23. Thermoregulated incubator and thermoregulated shaker incubator.
1. Automated FPLC system.
2. Octyl-Sepharose CL-4B.
3. Prepacked Superdex 200 10/300 GL column for gel filtration chromatography.
4. Lysis buffer: Tris 20 mM, sucrose 200 mM, and NaCl 150 mM pH 8.0.
5. Buffer A: 30 mM Pipes (piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), pH 6.2, and 50 mM CaCl₂.
6. Buffer B: 10 mM Pipes, pH 6.2, and 0.1 mM EDTA.
7. Buffer C: 10 mM Pipes, pH 6.2, 0.1 mM EDTA, and 50 mM NaCl.
8. Amicon Ultra centrifugal filter units with 10 and 30 kDa cutoff.

2.3 Protein Analysis

1. Protein concentrations were determined routinely using the Bradford procedure [26] with dye reagent and bovine serum albumin (BSA) as the standard.
2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) performed by the method of Laemmli [27].
3. Staining solution: 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% ethanol, and 10% acetic acid.
4. Destaining solution: 40% ethanol and 10% acetic acid.

2.4 PLD α Assay

1. Stock solution of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) 100 mM in chloroform.
2. Equimolar mixture of SDS and Triton X-100 (3.1 mM each).
3. Bath-type sonicator.
4. CaCl₂ 0.3 M.
5. Revealing assay mixture: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.7 mM 4-aminoantipyrine, 9 mM sodium 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzenesulfonate, 0.5 U choline oxidase, and 0.5 U peroxidase.
6. Microtiter plate-scanning spectrophotometer.

3 Methods

3.1 Construction of the Expression Plasmid

1. Amplify by PCR the cDNA (2430 bp) encoding the PLD α of *Vigna unguiculata* cloned into the pYL1392 vector obtained as previously described [17] using *Pfu* DNA polymerase and the following primers: forward 5'-CCTGAATTCGCCATGGC GCAAAATTCGTTC-3' and reverse 5'-AGTCTAGACC ATGCTATGCTAAC-3', introducing *EcoRI* and *XbaI* sites (underlined) immediately upstream of the start codon ATG and downstream of the stop codon, respectively.
2. Purify the PCR product and digest it by *EcoRI* and *XbaI* restriction enzymes.
3. Digest the cloning vector pGAPZB (Invitrogen) by the same restriction enzymes, and purify.
4. Ligate the PCR product into the pGAPZB vector by incubating with the T4 DNA ligase for 1 h as recommended by the enzyme supplier.
5. Transform 40 μ L of DH5 α *Escherichia coli* competent cells by electroporation with 1 μ L of ligation product.
6. Select the clones on LB plate containing 100 μ g/mL Zeocin.
7. Isolate the plasmid DNA using the alkaline lysis procedure [28], and purify using the Wizard Plus DNA Purification System (Promega).
1. Linearize 5 μ g of the pGAPZB vector containing PLD α cDNA (pGAPZB-PLD α) using *Ava*II restriction enzyme.
2. Transform the X33 strain of *Pichia pastoris* with the linearized recombinant plasmid by electroporation under a charging voltage of 1500 V, a capacitance of 40 μ F, and a resistance of 150 Ω (*see Note 1*).
3. Immediately after cell transformation, add 1 mL of ice-cold 1 M sorbitol into the cuvette.
4. Incubate for 1 h at 30 $^{\circ}$ C.
5. Plate the aliquots onto YPD plates containing 100 μ g/mL Zeocin (*see Note 2*).
6. Incubate plates for 3 days at 30 $^{\circ}$ C.
7. Isolate single colonies, and grow each clone overnight at 30 $^{\circ}$ C in a 5-mL YPD medium containing Zeocin, with orbital agitation at a rate of 100 rpm.
8. Mix 10 μ L of yeast suspension with 5 μ L of zymolyase (1 mg/mL, final concentration), incubate for 10 min at 30 $^{\circ}$ C, and then immerse in liquid nitrogen for 1 min.

3.3 Expression of Recombinant PLD α

9. Amplify the yeast genomic DNA by PCR using *Pfu* DNA polymerase as well as forward (pGAP promoter) and reverse (3' AOX1) primers from the Invitrogen *Pichia* kit (*see Note 3*).
10. Confirm the insertion of the *Vigna unguiculata* PLD α gene into the yeast genome by analyzing the PCR products on 1% agarose gel.

1. Perform a pre-culture growth for 24 h in a 250-mL Erlenmeyer flask containing 50 mL YPD medium (*see Note 4*).
2. Inoculate 50 mL of an overnight *P. pastoris* recombinant cell culture in 1 L of YPD medium, and incubate at 30 $^{\circ}$ C with orbital shaking (250 rpm) for 4 days.
3. Harvest *P. pastoris* cells by centrifugation at 5,000 $\times g$.
4. Incubate half of the pellet in 30 mL of lysis buffer with 0.1 mg/mL of zymolyase for 45 min at 30 $^{\circ}$ C under agitation.
5. Sonicate the solution stored on ice five times 3 min at full power, cycle 0.5 s, resting 1 min between each cycle.
6. Remove insoluble materials from the resulting cell lysate by centrifugation for 10 min at 10,000 $\times g$ at 4 $^{\circ}$ C.
7. Dialyze the supernatant (25 mL) overnight at 4 $^{\circ}$ C against buffer A (1 L).
8. Centrifuge at 10,000 $\times g$ and collect the supernatant.

3.4 PLD Activity Measurement

3.4.1 Micellar Substrate Preparation

1. Add in a glass vial 500 μ L of 100 mM DMPC stock solution, evaporate chloroform with the stream of nitrogen gas, and then add equimolar mixture SDS/Triton-X100 solution (3.1 mM each) to obtain a 10 mM DMPC solution.
2. Vortex the dispersion for 1 min; at this step the solution is cloudy.
3. Sonicate the substrate dispersion using a bath-type sonicator for 10 min, and vortex again for 30 s; at this step the solution is clear.
4. Dilute to 1 mM DMPC concentration in the SDS/Triton-X100 solution to use in the PLD assay.

3.4.2 PLD Assay

1. The PLD activity is assayed spectrophotometrically by measuring the free choline released upon DMPC hydrolysis in a microtitration plates adapted from Takama and Taylor [29]. The amount of free choline is quantified colorimetrically, after oxidation to betaine by choline oxidase with simultaneous production of hydrogen peroxide, which allows oxidative coupling of 4-aminoantipyrene and sodium 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzene sulfonate by peroxidase to give a maximal absorbance at 500 nm.

2. Incubate 50 μL of the enzyme solution with 40 μL of the 1 mM DMPC in SDS/Triton-X100 solution at 30 °C.
3. Start the reaction for 5 min by adding 10 μL of CaCl_2 0.3 M solution (30 mM, final concentration).
4. Stop the reaction, and reveal the PLD activity by adding 50 μL of the revealing assay mixture (*see* Subheading 2.4, item 5).
5. The PLD-generated choline is quantified by the end point measurement by recording the absorbance at 500 nm, based on a standard curve obtained with pure choline. Control assays are performed simultaneously in the absence of PLD.

3.5 Purification of Recombinant PLD α

3.5.1 Octyl-Sepharose Chromatography

1. Pack a chromatography column (2.5 \times 20 cm) with octyl-Sepharose CL-4B resin, and connect it to the FPLC system.
2. Equilibrate octyl-Sepharose CL-4B column overnight with buffer A at 1 mL/min.
3. Load the soluble fraction obtained at Subheading 3.3, step 8 (25–30 mL) onto column at 1 mL/min.
4. Wash unbound proteins from the resin using at least two–three column volumes of buffer A. The protein elution profile is recorded spectrophotometrically at 280 nm, and fractions (5 mL) are collected using FPLC fraction collector.
5. Once the absorbance reached the baseline level, elute the proteins bound to the column with buffer B containing EDTA.
6. Monitor column fractions by measuring PLD activity as described in Subheading 3.4 (using 5 μL of column fraction per assay). A typical elution profile is shown in Fig. 1.
7. The quality of the purified protein is checked by SDS-PAGE (*see* Note 5 and Fig. 1).
8. Pure PLD fractions is concentrated using an Amicon Ultra 30 kDa centrifuge filter device by centrifugation 2,500–3,000 $\times g$ for 3 min.

3.5.2 Gel Filtration Chromatography

The combination of at least five successive purifications on octyl-Sepharose column is necessary to accumulate enough protein for the following steps:

1. Equilibrate prepacked Superdex 200 10/300 GL column overnight with buffer C (*see* Note 6) at 0.5 mL/min.
2. Load 500 μL sample obtained from octyl-Sepharose chromatography at 5 mg/mL onto Superdex 200 column at a flow rate of 0.5 mL/min.
3. The protein elution profile is recorded spectrophotometrically at 280 and 254 nm. Fractions (0.5 mL) are collected using FPLC fraction collector.
4. The elution profile is checked by SDS-PAGE (*see* Note 5 and Fig. 2).

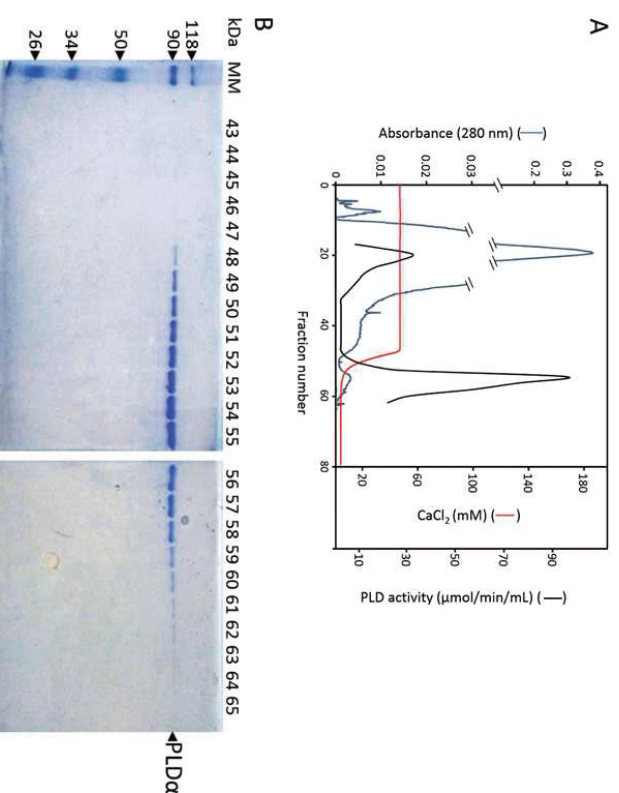


Fig. 1 Purification of recombinant *Vigna unguiculata* PLD α expressed in *P. pastoris*. **(a)** Elution profile of PLD α from octyl-Sepharose column; **(b)** proteins from the fractions (43–65) showing PLD α activity were analyzed by performing SDS-PAGE (10% acrylamide) and stained with Coomassie brilliant blue. MM Molecular mass markers

4 Notes

1. In negative control assays, *P. pastoris* cells were transformed with pGAPZB not carrying the PLD α gene.
2. Plate 50, 100, and 200 μL of the transformation reaction.
3. The PCR reaction included 30 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, hybridization at 54 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min. The last cycle at 72 °C was extended for an additional 5 min.
4. Small-scale expression trials (5 mL) were first performed to identify the most productive clones and to determine optimum methods of PLD α expression.
5. The gel was stained with staining solution for 20 min with gentle agitation and destained with destaining solution.

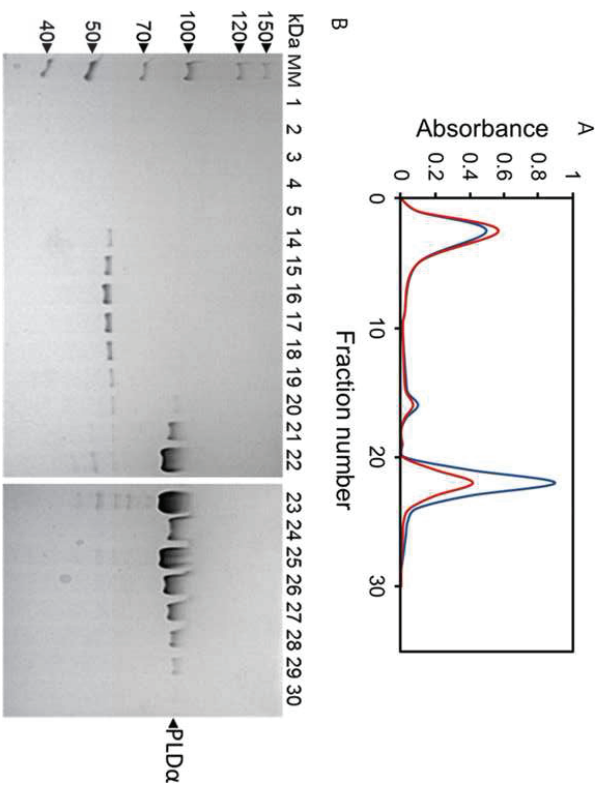


Fig. 2 Gel filtration chromatography. (a) Purification chromatogram. Blue curve, absorbance at 280 nm; red curve, absorbance at 254 nm. (b) Proteins from the eluted fractions were analyzed by performing SDS-PAGE (10% acrylamide) and stained with Coomassie brilliant blue. *MM* Molecular mass markers

Change the destaining solution several times until background of the gel is fully destained.

6. For crystallization studies NaCl is added at 50 mM final concentration directly into the concentrated protein solution. Buffer C is the buffer B supplemented with NaCl 50 mM.

Acknowledgments

The French "Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche" is gratefully acknowledged for the funding of Yari Arhab and Renaud Rahier.

References

- Jenkins GM, Frohman MA (2005) Phospholipase D: a lipid-centric review. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2305-2316. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5195-z>
- Selvy PE, Lavieci RR, Lindsley CW, Brown HA (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111(10):6064-6119. <https://doi.org/10.1021/cr200296t>
- Ulbrich-Hofmann R, Lerchner A, Ohlozinsky M, Bezakova L (2005) Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnol Lett* 27(8):535-544. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-3251-2>
- Zheng L, Krishnamoorthi R, Zolkiewski M, Wang X (2000) Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase dalpha and beta. *J Biol Chem* 275(26):19700-19706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001945200>
- Zheng L, Shan J, Krishnamoorthi R, Wang X (2002) Activation of plant phospholipase Dbeta by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: characterization of binding site and mode of action. *Biochemistry* 41(14):4546-4553
- Hanahan DJ, Chalkoff IL (1947) The phosphorus-containing lipids of the carrot. *J Biol Chem* 168(1):233-240
- Aboussallam A, Riviere M, Teissere M, Verger R (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim Biophys Acta* 1158(1):1-7. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90088](https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90088)
- Wang X, Dyer JH, Zheng L (1993) Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys* 306(2):486-494
- Aboussallam A, Teissere M, Gardies AM, Verger R, Noat G (1995) Phospholipase D from soybean (*Glycine max* L.) suspension-cultured cells: purification, structural and enzymatic properties. *Plant Cell Physiol* 36(6):989-996
- Abdelkafi S, Aboussallam A (2011) Kinetic study of sunflower phospholipase Dalpha: interactions with micellar substrate, detergents and metals. *Plant Physiol Biochem* 49(7):752-757. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.002>
- Kharoon H, Mansfield J, Schierhorn A, Ulbrich-Hofmann R (2015) Purification, sequencing and characterization of phospholipase D from Indian mustard seeds. *Phytochemistry* 117:65-75. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.022>
- Zhao J, Wang X (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. *J Biol Chem* 279(3):1794-1800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309529200>
- Wang X, Xu L, Zheng L (1994) Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* 269(32):20312-20317
- Ueki J, Morioka S, Komari T, Kumashiro T (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 Physiol* 36(5):903-914
- Schäffner I, Rücknagel K-P, Mansfield J, Ulbrich-Hofmann R (2002) Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage. *Eur J Lipid Sci Technol* 104(2):79-87
- Dyer JH, Zheng L, Wang X (1995) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding phospholipase D from arabidopsis. *Plant Physiol* 109:1497
- El Maarouf H, Carriere F, Riviere M, Aboussallam A (2000) Functional expression in insect cells, one-step purification and characterization of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Protein Eng* 13(11):811-817
- Ben Ali Y, Carriere F, Aboussallam A (2007) High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Protein Expr Purif* 51(2):162-169. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.07.018>
- Rahier R, Noirié A, Aboussallam A (2016) Functional characterization of the N-terminal C2 domain from *Arabidopsis thaliana* phospholipase Dalpha and Dbeta. *Biomol Res Int* 2016:2721719. <https://doi.org/10.1155/2016/2721719>
- Lambrecht R, Ulbrich-Hofmann R (1992) A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373(2):81-88
- Leiros I, Secundo F, Zambonelli G, Servi S, Hough E (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* 8(6):655-667
- Penning GP, Kerr ID (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 Sci* 5(5):914-922. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050513>
- Ullah A, de Giuseppe PO, Murakami MT, Trevisan-Silva D, Wille AC, Chaves-Moreira D, Gremski LH, da Silveira RB, Semf-Ribeiro A, Chaim OM, Veiga SS, Arni RK (2011) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxoscelis intermedia* venom. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67

Article 3

Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2018).

Phospholipases: An Overview.

[Methods Mol Biol.](#) 2018;1835:69-105. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_3.

- (Pt 2):234–236. <https://doi.org/10.1107/S1744309110050931>
24. Abergel C, Abousalham A, Chenivisse S, Riviere M, Moustakas-Gardies AM, Verger R (2001) Crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 2):320–322
25. Stunpe S, Konig S, Ulbrich-Hofmann R (2007) Insights into the structure of plant alpha-type phospholipase D. *FEBS J* 274(10):2630–2640. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05798.x>
26. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
27. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685
28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd. edn. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, New York
29. Takama JF, Taylor KE (1991) A continuous spectrophotometric method for monitoring phospholipase D-catalyzed reactions of physiological substrates. *J Biochem Biophys Methods* 23(3):217–226



Chapter 3

Phospholipases: An Overview

Ahmed Aloulou, Renaud Rahier, Yani Arthab, Alexandre Noiriel, and Abdelkarim Abousalham

Abstract

Phospholipases are lipolytic enzymes that hydrolyze phospholipid substrates at specific ester bonds. Phospholipases are widespread in nature and play very diverse roles from aggression in snake venom to signal transduction, lipid mediator production, and metabolite digestion in humans. Phospholipases vary considerably in structure, function, regulation, and mode of action. Tremendous advances in understanding the structure and function of phospholipases have occurred in the last decades. This introductory chapter is aimed at providing a general framework of the current understanding of phospholipases and a discussion of their mechanisms of action and emerging biological functions.

Key words: Phospholipase A₁, Phospholipase A₂, Phospholipase B, Phospholipase C, Phospholipase D, Phospholipids, Classification, Physiological function

1 Introduction

Most cells contain a multitude of phospholipases that can either exist as secreted forms, membrane associated, or intracellular located. The functions of phospholipases are as diverse as their properties and cellular/tissue localizations. Two general sets of phospholipases exist, the acylhydrolases and the phosphodiesterases. Enzymes within each set are classified according to the site of the bond cleaved in their phospholipid substrates (Fig. 1). Phospholipase A₁ (PLA₁), phospholipase A₂ (PLA₂), and phospholipase B (PLB) constitute the acylhydrolases, whereas the phosphodiesterases are represented by phospholipase C (PLC) and phospholipase D (PLD). PLA₁ and PLA₂ produce free fatty acids (FAs) and 2-acyl or 1-acyl-lysophospholipids, respectively. PLB is able to hydrolyze both the *sn*-1 and *sn*-2 FAs of phospholipids. PLC cleaves the glycerophosphate bond and PLD removes the headgroup of the phospholipid. The TUBMB enzyme nomenclature for PLA₁, PLA₂, PLB, PLC, and PLD is EC 3.1.1.32, EC 3.1.1.4, EC 3.1.1.5, AC 3.1.4.3, and EC 3.1.4.4, respectively. One

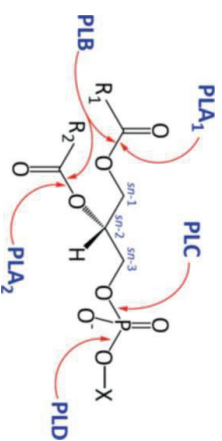


Fig. 1 Typical glycerophospholipid structure and the site of action of various phospholipases. The glycerophospholipid molecule consists of a glycerol-3-phosphate esterified at its *sn*-1 and *sn*-2 positions with nonpolar fatty acids (R_1 and R_2 , respectively) and at its phosphoryl group to a polar headgroup, containing alcohol, X (e.g., choline, ethanolamine, or inositol). The various sites of attack for hydrolytic cleavage of the various phospholipase types A_1 , A_2 , B, C, and D are shown with arrows. The carbon atoms of the glycerol backbone of the glycerophospholipid are indicated according to the stereochemical numbering (*sn*-1, *sn*-2, and *sn*-3)

must however realize that many enzymes have a broad substrate specificity and that a phospholipase being classified as a 3.1.1.32 enzyme might also have an activity, for example, as a triacylglycerol lipase (3.1.1.3) [1–3].

2 Phospholipases A_1

PLA_1 s catalyze the hydrolysis of phospholipids at the *sn*-1 position to form 2-acyl-lysophospholipids and fatty acids. In contrast to other phospholipases, physiological functions of PLA_1 enzymes remain largely unknown [4, 5]. PLA_1 enzymes may have specific roles in producing bioactive lysophospholipid mediators, such as lysophosphatidylserine (lysolPS), lysophosphatidylinositol (lysolPI), and lysophosphatidic acid (lysolPA) [6]. There is some evidence to suggest that some PLA_1 s play an important role as virulence factors for bacterial and fungal pathogenesis [7, 8]. The PLA_1 activity is conserved in a wide range of organisms, and various PLA_1 s have been cloned and characterized [5, 9], such as PS-specific PLA_1 s (PS- PLA_1 s) [10], PA-selective PLA_1 (PA- PLA_1) [11], PI-3-phosphate-specific PLA_1 s (PI3P- PLA_1 s) [12], PLA_1 from vespid venom [13, 14], and PLA_1 s from *Arabidopsis thaliana* [15–17]. All PLA_1 s have the typical Ser-His-Asp catalytic triad. Some PLA_1 s belong to the pancreatic lipase gene family which is conserved in a wide range of organisms from insects to mammals [9, 18]. Two molecular characteristics of these PLA_1 s emerge from sequence/structure comparisons: the presence of a very short lid and the deletion of the β 9 loop compared to the pancreatic lipases. These differences were suggested to be the key to the PLA_1 activity [9, 18]. While

3 Phospholipases A_2

some PLA_1 s, such as PS- PLA_1 s, PI3P- PLA_1 s, and PA- PLA_1 s, show a strict PLA_1 activity and hydrolyze exclusively phospholipids [9], various other PLA_1 s, such as pancreatic lipase-related proteins 2, have a broad substrate specificity and hydrolyze phospholipids, triglycerides, and galactolipids [5, 9, 18–21]. The lipase from the skin pathogen *Staphylococcus hyicus* is unique in having high PLA_1 activity, besides having considerable lipase activity [22]. The crystal structure of this enzyme in an open conformation shows the importance of Lys295 and Ser356 for phospholipid binding and PLA_1 activity [23]. This enzyme adopts the α/β hydrolase fold common to many lipases/esterases and has a Ser-His-Asp catalytic triad.

PLA_2 s hydrolyze the ester bond of membrane phospholipids from the *sn*-2 position. In vivo, the *sn*-2 position of phospholipids frequently contains polyunsaturated FAs, and when released, these can be metabolized to form various eicosanoids and related bioactive lipid mediators [24–26]. The remaining lysophospholipid moiety can also have important roles in biological processes [27]. The PLA_2 family is comprised of six types of diverse enzymes: GIV PLA_2 (cytosolic PLA_2 (c PLA_2)), GVI PLA_2 [calcium-independent PLA_2 (i PLA_2)], GVII and GVIII PLA_2 [platelet-activating factor acetylhydrolases (PAF-AHs)], GXV PLA_2 (lysosomal PLA_2), GXVI PLA_2 (adipose PLA_2), and several groups of secreted PLA_2 (s PLA_2). Each of these types is implicated in diverse kinds of lipid metabolism and disease progression, so it is hypothesized that PLA_2 s can serve as therapeutic targets for the treatment of several diseases [26, 28]. There has therefore been a tremendous interest in the pharmaceutical industry in developing selective and potent inhibitors of each of these PLA_2 types [24].

Assignment of PLA_2 s to a certain group is based on their catalytic mechanisms, localizations, evolutionary relationships, and structural features [29]. Most of these lipolytic enzymes have no structural similarity and have different regulatory and catalytic mechanisms [24, 25, 28]. Biological roles of PLA_2 s have been investigated using PLA_2 knockout (KO) or overexpressing transgenic mice, specific inhibitors, and information obtained from analysis of human diseases caused by mutations in PLA_2 genes, along with lipidomics approaches to elucidate in vivo substrates and metabolites [26]. However, the results using transgenic mice should be interpreted with caution, as a super-physiological level of PLA_2 , even in tissues or cells where the enzyme is not expressed, could result in an artificial phenotype.

3.1 Secreted PLAs

The secreted PL_{A2} (sPL_{A2}) family contains ten catalytically active isoforms (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, and XIA) and one inactive isoform (XIIB) in mammals [28, 30, 31]. Conventional sPL_{A2}s (GI/II/V/X) are closely related low-molecular-weight enzymes, ranging in size from 14 to 19 kDa, with a highly conserved Ca²⁺-binding loop and a His/Asp catalytic dyad as well as conserved disulfide bonds, while atypical sPL_{A2}s (GIII/XII) are each classified into distinct classes [29, 30, 32, 33]. Understanding the structure and function of sPL_{A2} isoforms is important for a better understanding of the pathology of sPL_{A2}-related diseases in humans. Unfortunately, to date, only groups IIA and X protein structures have been resolved [34, 35].

Because sPL_{A2}s are secreted and require millimolar Ca²⁺ for their catalytic action, they principally target phospholipids in the extracellular space [28, 30, 31]. sPL_{A2}s strictly hydrolyze the *sn*-2 fatty acyl esters of glycerophospholipids and show distinct substrate specificity in terms of the polar head groups or *sn*-2 FAs [36]. For instance, sPL_{A2}-X is very active on phosphatidylethanolamine (PE), while sPL_{A2}-IIA has much higher affinity for negatively charged phospholipid head groups, in particular PS, phosphatidylglycerol (PG), and phosphatidylethanolamine (PE). This preference is useful for sPL_{A2}-IIA role as defensive proteins, as PE and PG are major components of bacterial membranes [37]. This substrate selectivity is partly attributable to their crystal structures [34, 36, 38]. With regard to *sn*-2 fatty acid specificity, sPL_{A2}-IB, sPL_{A2}-IIA, and sPL_{A2}-III do not discriminate fatty acid species, sPL_{A2}-V tends to prefer those with a lower degree of unsaturation such as oleic acid, and sPL_{A2}-X tends to prefer polyunsaturated FAs such as arachidonic acid (AA) [39, 40]. Some sPL_{A2} isoforms (e.g., GIB/III/X) are secreted as proenzymes and require cleavage at the N-terminus to be fully active [41].

It is now obvious that individual sPL_{A2}s play distinct biological roles through generation of a variety of lipid mediators, promotion of membrane remodeling, and modification of extracellular phospholipids, including adjacent cell membranes, microparticles, lipoproteins, and noncellular lipid components (e.g., surfactants), and foreign phospholipids in microbes and food [42]. The diversity of target phospholipids and products may explain why the sPL_{A2} family contains multiple isoforms exhibiting unique tissue/cellular distributions and substrate selectivity. The action of sPL_{A2}s on cellular membranes should not be limited to the release of AA, but also that of other unsaturated fatty acids, such as ω-3 fatty acids (precursors of anti-inflammatory lipid mediators), and lysophospholipids [30].

Most mammalian cells contain several sPL_{A2}s suggesting they have distinct functions. PL_{A2}-overexpressing transgenic mice for different sPL_{A2}s display distinct phenotypes. The most likely explanation is that individual sPL_{A2}s have distinct enzymatic properties,

acting on different phospholipid substrates and mobilizing different lipid metabolites *in vivo*. Accumulating evidence obtained from KO mice for different sPL_{A2}s suggests that each sPL_{A2} displays unique substrate selectivity and tissue distribution, which implies that sPL_{A2}s are not “functional” isozymes *in vivo* [30, 43].

Although they are secreted enzymes, certain sPL_{A2}s can also act intracellularly to release *sn*-2 acyl chains, including AA, before being secreted [44, 45]. Some sPL_{A2}s (e.g., GV/X) effectively hydrolyze cell surface phospholipids upon secretion [36, 46]. Others, such as GIIIA, are unable to hydrolyze cell surface phospholipids but play a role in host defense by degrading bacterial phospholipids [47]. Certain sPL_{A2}s use phospholipids in serum lipoproteins and may function to promote atherogenesis [48].

Not all sPL_{A2} isoforms have the same functions in disease. For example, the role of sPL_{A2}-V in inflammation is controversial. Certain studies suggest that sPL_{A2}-V is a pro-inflammatory factor in allergic airway inflammation, acute lung injury, and atherosclerosis [49]. In contrast, some studies suggest an anti-inflammatory effect for sPL_{A2}-V via clearing deposition of immune complexes through cysteinyl leukotriene receptor phagocytosis [50]. As is the case for most PL_{A2} isoforms, the role of sPL_{A2}-V in inflammation is probably cell-dependent.

Maintaining sPL_{A2} homeostasis is suggested to be critical for several physiological functions [30, 31, 42]. A better understanding of the regulation of sPL_{A2} isoforms can only lead to a greater potential to identify therapeutic avenues for inhibiting these enzymes. sPL_{A2}s are regulated by different mechanisms, including cell signaling induced by lipids, and even other PL_{A2}s (i.e., PL_{A2} cross talk) [44]. Similar to their differential role in pathologies, the regulatory mechanisms mediating sPL_{A2} expression and activity appear to be isoform and cell specific. Additionally, protein–protein interactions (the sPL_{A2} interactome) can regulate sPL_{A2} activity, independently of the sPL_{A2} active site, by binding to PL_{A2} receptors (PL_{A2}Rs). Binding of sPL_{A2} isoforms to PL_{A2}Rs inhibits sPL_{A2} catalytic activity and alters cellular function [31]. Therefore, the phenotypes displayed in sPL_{A2} gene-manipulated mice may not rely merely on the changes in lipid mediator signaling (more particularly eicosanoid signaling) but may also involve one or a combination of the above possibilities [26, 30, 31, 42].

Since each sPL_{A2} displays a unique expression pattern in different cell types within restricted tissues, one should consider when and where the different sPL_{A2} isoforms are expressed, which isoforms are involved in what types of pathophysiology, and how they exhibit their specific functions in order to comprehensively understand the specific functions of individual sPL_{A2}s.

The extracellular localization of sPL_{A2} isoforms makes them feasible targets for treatment of diseases where sPL_{A2} expression is elevated. A current challenge in the field is elucidating the

biological effect of specific sPLA₂ isoforms in diseases as well as identifying biological inhibitors. Another complication comes from the fact that these biological inhibitors may be cell-, tissue-, or disease-dependent. Investigations to identify and characterize the sPLA₂ interactome should be a rewarding area of research to identify drug targets for diseases that involve inflammation, the immune system, and cancer.

3.2 Cytosolic PLA₂s

The GIV PLA₂ family is comprised of six intracellular enzymes (GIV-A, GIV-B, GIV-C, GIV-D, GIV-E, and GIV-F) commonly referred to as cytosolic PLA₂ (cPLA₂) α , cPLA₂- β , cPLA₂- γ , cPLA₂- δ , cPLA₂- ϵ , and cPLA₂- ζ , respectively [51, 52]. The six members of the cPLA₂ family (cPLA₂ α , cPLA₂- β , cPLA₂- γ , cPLA₂- δ , cPLA₂- ϵ , and cPLA₂- ζ) share only about 30% homology and have differences in enzymatic properties, tissue expression, and subcellular localization, suggesting that they are not redundant [51–53]. They contain a Ser-Asp catalytic dyad, and all, except cPLA₂- γ , have an N-terminal β -sandwich C2 domain attached to a C-terminal catalytic domain by a flexible linker [51]. Analysis of the intracellular kinetic and binding properties of the cPLA₂ family showed that they exhibit very different relative lysophospholipase, PLA₂, and PLA₁ activities, inhibitor sensitivities, calcium dependence, and activation by anionic phospholipids, highlighting potential differences in regulation and function [51, 52, 54].

With the exception of the established role of cPLA₂ α in initiating production of lipid mediators, including AA, diverse prostaglandins, leukotrienes, and lysophospholipids, little is known about the *in vivo* function of other cPLA₂ isoforms. However, there is evidence emerging from studies using cultured cells that members of the cPLA₂ family, including cPLA₂ α , play a role in regulating membrane trafficking that does not involve production of oxygenated metabolites of AA [52, 53, 55, 56].

cPLA₂ α is a highly conserved widely expressed enzyme in mammalian cells that promotes the production of lipid mediators derived from its products, AA and lysophospholipids, in response to extracellular stimuli [52, 57–59]. The regulation of cPLA₂ α is complex, involving transcriptional and posttranslational processes. cPLA₂ α expression is also induced transcriptionally through a number of signaling pathways [60, 61]. cPLA₂ α is rapidly activated in cells by posttranslational processes, including increases in intracellular calcium and phosphorylation by protein kinases. These signaling pathways are activated in cells through engagement of many types of receptors, indicating that cPLA₂ α activation and AA release occur commonly in response to cell stimulation [52, 62].

In brief, intracellular calcium increase promotes the translocation of cPLA₂ α from the cytosol to intracellular membrane [63]. Calcium binds to the N-terminal C2 domain of cPLA₂ α

that increases the hydrophobicity of the calcium-binding loops, which penetrate the membrane bilayer [64–67].

Differences in phospholipid-binding specificity of the C2 domains of protein kinase C (PKC) to anionic phospholipids and of cPLA₂ α to PC play an important role in determining their distinct subcellular targeting to the plasma membrane and intracellular membranes, respectively [68, 69]. The catalytic domain is then positioned on the membrane by calcium-independent mechanisms [70, 71]. cPLA₂ α preferentially translocates to the Golgi apparatus and, at higher intracellular calcium concentrations, to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope [63]. Translocation of cPLA₂ α to the membrane is necessary but not sufficient for cPLA₂ α to release AA. The catalytic activity of cPLA₂ α is regulated by phosphorylation of Ser residues at positions 505, 515, and 727 by protein kinases [72–74] and also by basic residues in the catalytic domain that are sites for activation by polyphosphoinositides [75]. The basic residues are required for the ability of cPLA₂ α to release AA in cells but are not required for translocation of cPLA₂ α to the Golgi [73]. Collectively, the results show that the ability of cPLA₂ α to release AA in cells involves a calcium-dependent membrane binding and optimization of catalytic activity by phosphorylation and interactions of basic residues in the catalytic domain with anionic components, perhaps polyphosphoinositides, in the membrane [73].

In addition to PLA₂ activity, cPLA₂ α catalyzes other enzymatic reactions through the Ser-Asp catalytic dyad, including PLA₁, lysophospholipase, and transacylase activity, although the physiological relevance of these activities *in vivo* is unknown [28, 51, 76]. The intense focus on cPLA₂ α stems from its preferential hydrolysis of *sn*-2 AA and its well-established role in initiating the release of AA for the production of lipid mediators [59, 77]. To date there are no X-ray structures on phospholipid analogs bound to the active site of cPLA₂s so it is not possible to understand why these enzymes have multiple phospholipase activities.

Considerable understanding of cPLA₂ α function has been derived from investigations of the enzyme and from cPLA₂ α KO mice, but knowledge of discrete roles for this enzyme in humans is still limited [52]. Mice deficient in cPLA₂ α have revealed that there are alternative pathways for lipid mediator production [78, 79]. These results point to a possible compensation from iPLA₂s, sPLA₂s, or other cPLA₂ isoforms.

Due to the key role of cPLA₂ α in mediating lipid mediator production and its widespread tissue expression, it is implicated in regulating homeostatic processes and disease pathogenesis throughout all mouse organ systems [52]. There are a number of issues in considering cPLA₂ α as a therapeutic target for treating a plethora of diseases, especially because most of the studies are based on disease models comparing cPLA₂ α WT and KO mice, which in

some cases may not accurately reflect processes contributing to human disease. Human beings recently identified with cPLA α deficiency exhibit more pronounced effects on health than observed in mice lacking cPLA α , indicating that much remains to be learned about this interesting enzyme [80–93]. These findings have significant implications for the safety and effectiveness of pharmacologic inhibition of cPLA α .

The physiological function of cPLA α is difficult to predict because it is upstream of many anti-inflammatory and pro-inflammatory lipid mediators and the specific impact of these mediators in different tissues. The large repertoire of receptors for lipid mediators is differentially expressed in tissues and promotes signaling pathways with distinct effects on cell function. This adds another level of complexity in understanding the role of cPLA α -derived bioactive lipids in organ-specific disease pathogenesis [52].

Unlike cPLA α , there is less conservation of other cPLA γ isoforms throughout evolution, and their tissue distribution differs between mice and humans. This suggests that the function of other cPLA γ isoforms may differ among species, although this remains to be determined [51, 52].

3.3 Calcium-Independent PLA s

The Ca $^{2+}$ -independent PLA s (iPLA s) are ubiquitously expressed intracellular enzymes that do not require Ca $^{2+}$ for activity. Due to their shared homology with patatin, iPLA s are included in the patatin-like protein family and are also referred to as patatin-like phospholipases (PNPLA s). iPLA s also share lipase (GX XX G) and nucleotide-binding (GX GX XXG) consensus sequences [94]. The catalytic site of iPLA s is similar to cPLA s ; iPLA s are designated as GVI iPLA s [95] and include seven members: iPLA β (VIA-1 and VIA-2), iPLA γ (VIB), iPLA δ (VIC), iPLA ϵ (VID), iPLA ζ (VIE), and iPLA η (VIH). Three others (iPLA θ , iPLA ι , and iPLA κ) have been recognized, but very little is known about them, and they are not yet assigned to GVI [96, 97]. iPLA β and iPLA γ are the most widely studied.

iPLA s demonstrate no substrate specificity and manifest PLA γ /PLA ι , lysophospholipase, transacylase, and thioesterase activities illustrating their enzymatic and functional diversity [94, 98–101]. iPLA s are localized either to the cytosol, inner side of the cell membrane, endoplasmic reticulum, or mitochondrial membrane [94]. iPLA s participate in a multitude of biological processes, including fat catabolism, cell differentiation, maintenance of mitochondrial integrity, phospholipid remodeling, cell proliferation, signal transduction, and cell death [102]. Important links between iPLA γ dysregulation and various diseases have come to the forefront [28, 94, 103–107].

The extensively studied iPLA β (PNPLA9) may function in phospholipid acyl remodeling but clearly is a regulated enzyme that plays a signaling role in mediating AA release and regulating

calcium homeostasis [58, 94, 108]. Though under basal conditions iPLA β is predominantly localized in the cytosol [109], translocation of iPLA β to the Golgi, endoplasmic reticulum, mitochondria, and nucleus is evident under stimulatory conditions [110]. Alternate splicing events generate iPLA β variants that differ in their subcellular localization, catalytic activity, and likely cellular function [111]. iPLA β is a candidate for numerous truncations at the N- and C-terminal ends [110, 112], but the activities and biological roles manifested by these products have not yet been discerned. iPLA β has PLA γ activity with no acyl chain selectivity and weaker lysophospholipase, PLA ι , and transacylase activities [99]. iPLA β also hydrolyzes fatty acyl-CoAs using the same active site that catalyzes phospholipid hydrolysis [100]. A KO mouse model has revealed that endothelial PAF production is entirely dependent on iPLA β activity [113]. Because inflammatory cell recruitment involves the interaction of endothelial cell PAF with PAF receptors on circulating cells, these data suggest that iPLA β may be a suitable therapeutic target for the treatment of inflammatory lung diseases.

iPLA γ (PNPLA8) hydrolyzes saturated and monounsaturated fatty acids at equal rates from the *sn*-1 or *sn*-2 position in diacyl PC substrates. However, it is less effective in releasing polyunsaturated FAs from the *sn*-2 position [114]. iPLA γ exhibits PLA γ and lysophospholipase activities, but also has PLA ι activity specific for 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-PC resulting in production of 1-lyso-2-arachidonoyl-PC [114]. This product may serve as a precursor for a variety of lipid mediators including free AA, the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, and its glycerol-linked prostaglandin derivatives [94]. Utilizing knockdown protocols or selective inhibition of iPLA γ versus iPLA β , several studies reported cytoprotective effects of iPLA γ [94]. To date, the only reported clinical manifestation relating to iPLA γ is a report that its absence is associated with myocardial dysfunction, cognitive deficits, and mitochondrial degeneration [115] in a case study that closely parallels the phenotype in iPLA γ -null mice [116].

iPLA δ (PNPLA6), also known as neurotathy target esterase, was recognized for manifesting phospholipase and lysophospholipase activities [117]. Expressed predominantly in neurons, iPLA δ localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus [118], and its inhibition or deletion leads to axonal degeneration [119]. iPLA ϵ (PNPLA3), also referred to as adiponutrin, is mainly expressed in intracellular membrane fractions in hepatocytes and adipocytes [120]. In addition to phospholipase activity, iPLA ϵ manifests lipase and acylglycerol transacylase activities [98], leading to the suggestion that it facilitates energy/lipid mobilization and storage in adipocytes. iPLA ϵ has been reported to restore lipid homeostasis by mediating acylation of lysophospholipids and hydrolyzing triglycerides in the liver [121–123]. iPLA ζ

(PNPLA₂), also known as TST2-2, desnutrin, and adipose triglyceride lipase (ATGL), exhibits lipase and acylglycerol transacylase activities [98]. For optimal activity, ATGL requires the cofactor comparative gene identification-58 (CGI-58), which amplifies the hydrolase activity 20-fold [124–126]. ATGL deficiency in macrophages and mice promotes mitochondrial dysfunction and leads to premature cell and animal death [127, 128]. iPLA₂η (PNPLA4), also known as gene sequence-2, exhibits lipase and acylglycerol transacylase activities [98]. iPLA₂η activation is proposed to contribute to regulation of anabolic and catabolic fluxes of acyl equivalents in tissues. iPLA₂ε, iPLA₂ζ, and iPLA₂η likely participate in triglyceride hydrolysis and acyl-Co-independent transacylation of acylglycerols, thereby facilitating energy mobilization associated with metabolic syndrome [98].

With continued studies of this family of PLA_s, a greater understanding of the importance of iPLA₂-derived lipid signaling in disease development can be attained, and this will facilitate identification of novel pathways that can potentially be targeted for drug therapy.

3.4 Platelet-Activating Factor Acetylhydrolases

Platelet-activating factor acetylhydrolases (PAF-AH) have a catalytic serine and serve to release acetate from the *sn*-2 position of PAF [24, 26, 28]. They do not require Ca²⁺ for catalysis. There are four members of this family; one secreted form, known as plasma-type PAF-AH or lipoprotein-associated PLA₂ (Lp-PLA₂), that has generated interest as a drug target for atherosclerosis and three other forms that are expressed intracellularly and referred to as PAF-AH type II (GVII) and PAF-AH type I (GVIII) which is composed of a homo- or heterodimer of the two closely related catalytic subunits, α1 and α2, complexed with another regulatory β subunit [26].

Lp-PLA₂ is a secreted serine-lipase that hydrolyzes oxidized phospholipids at the *sn*-2 position with remarkable specificity, yielding oxidized fatty acids and lysophospholipids. The crystal structure of this enzyme shows that it has a classic lipase α/β hydrolase fold and contains a Ser-His-Asp catalytic triad [130]. Lp-PLA₂ plays a central role in the pathophysiology of atherosclerosis, from its initiation to the progression of cardiovascular complications [131, 132]. The bioproducts of the Lp-PLA₂-mediated hydrolysis of oxidized phospholipids are pro-inflammatory and have an important role in inflammation and accordingly in atherogenesis [132]. This enzyme is not interfacially activated [133]. The mechanisms underlying the preferential binding of Lp-PLA₂ to low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) are currently poorly understood [134, 135]. Lp-PLA₂ is mostly produced in cells involved in atherosclerosis, such as

3.5 Lysosomal PLA_s

macrophages, T-cells, lymphocytes, and mast cells [136]. Increasing evidence supports the role and utility of Lp-PLA₂ as a marker or as a promising target for the treatment of atherosclerosis in preventive and personalized medicine [137–139]. Future studies need to focus on exploring the potential of this biomarker and evaluating the effects of Lp-PLA₂ inhibition on human populations.

Accumulated evidence suggests that PAF-AH-II plays a role in defense against oxidative stress, most likely by degrading oxidized phospholipids in the membranes [140]. However, the PAF-AH-I pathway may be linked to normal neuronal migration [141].

Two distinct types of lysosomal PLA_s have been identified: acidic Ca²⁺-independent PLA₂ (aiPLA₂) and lysosomal PLA₂ (LPLA₂) [142]. Although these two proteins are structurally quite distinct, they are localized in lysosomes, show acidic pH preference for catalysis, and play a common role in homeostatic surfactant metabolism [142].

aiPLA₂ is identical to peroxiredoxin 6 (Prdx6), a non-selenoprotein with glutathione peroxidase activity [143]. The peroxidase and PLA₂ enzymatic functions of aiPLA₂ have distinctly different active sites; the PLA₂ activity is Ser32-dependent, whereas the peroxidase activity requires Cys47 [144]. Gene targeting of this enzyme in mice hampers surfactant synthesis and causes neonatal death due to respiratory distress syndrome [145].

LPLA₂ is highly homologous with lecithin cholesterol acyltransferase and is phylogenetically related to a large group of plant phospholipases. Deficiency of LPLA₂ in mice results in foam cell formation, surfactant lipid accumulation, splenomegaly, and phospholipidosis [146].

3.6 Adipose PLA₂

The adipose-specific PLA₂ (AdPLA₂, GXVI) is found abundantly in white adipose tissue and appears to be responsible for supplying AA for prostaglandin synthesis within this tissue [147, 148]. Additionally, AdPLA₂ may have roles in energy regulation by clearing fatty acids from stored triglyceride. Depending on the assay conditions, the PLA₁ activity can exceed the PLA₂ activity of AdPLA₂ [28, 149]. AdPLA₂ belongs to the lecithin retinol acyltransferase family and is identical to H-Rev107, which was originally cloned as a negative regulator of proto-oncogene Ras and classified as a class II tumor suppressor [150]. AdPLA₂ is induced during preadipocyte differentiation into adipocytes [147]. Evidence from AdPLA₂ KO mice suggests that AdPLA₂ may promote obesity through a mechanism distinct from prostaglandin signaling [151].

4 Phospholipase B

PLB enzymes cleave at both *sn*-1 and *sn*-2 positions of diacyl- or lysophospholipids. The distinction between PLBs and lysophospholipases can often be muddled since most PLBs possess a lysophospholipase activity [152]. Thus, there is some confusion in nomenclature for these enzymes [153]. Synonyms including lysophospholipase and lysophospholipase-transacylase are used for PLB. The hydrolase activity allows the enzyme to cleave fatty acids from both phospholipids (PLB activity) and lysophospholipids (lysophospholipase activity), while the transacylase activity allows the enzyme to produce phospholipids by transferring a fatty acid to a lysophospholipid.

PLB hydrolase and acyltransferase activities have been described in many microbial species, protozoa, and mammalian cells [153–159]. There is evidence that PLBs are an important part of the virulence repertoire of pathogenic fungi [160].

5 Phospholipase C

PLCs are defined as phosphodiesterases that catalyze the cleavage of the proximal phosphodiester bond of glycerophospholipids, between the phosphate group and the glycerol backbone, producing diacylglycerols and water-soluble phosphorylated headgroups [161]. According to their substrate specificities, PLCs can generally be divided into PC-specific PLC (PC-PLC) [that acts preferentially on PC] and PI-specific PLC (PI-PLC) [that hydrolyzes (almost) exclusively PI].

PC-PLCs, also called non-specific PLCs, display broad substrate specificity and have been reported to occur in bacteria [162], mammalian cells [163, 164], and plants [165, 166]. Various bacterial PC-PLCs have been identified as potent toxins in Gram-positive bacteria, including *Clostridium* species, *Listeria monocytogenes*, and *Bacillus cereus*, as well as in Gram-negative bacteria, such as *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas* species, and *Legionella pneumophila* [167–171]. Bacterial PC-PLCs have broad substrate specificity that, in addition to PC, includes PE, PS, and sphingomyelin [171]. Gram-positive PC-PLCs are activated by Zn²⁺ and reversibly inactivated by metal chelators [171]. Three-dimensional structure of PC-PLC from *B. cereus* [167] revealed that the enzyme consisted of seven helices forming a twisted barrel structure with three Zn²⁺ coordinated within the active site region [167].

Mammalian PC-PLCs have emerged as key components of a broad range of cellular and physiological processes, such as apoptosis [172, 173], activation of gene transcription factors and

mitogen-driven extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in fibroblasts [174], neuronal differentiation [175], and activation of the immune system [176]. PC-PLCs are strongly activated and overexpressed in epithelial ovarian and breast carcinoma cell lines [177–180]. Various isoforms with varying molecular masses have been isolated from mammalian cells [181, 182]. However, none of these isoforms has been cloned or sequenced, which constitutes a real obstacle toward the molecular characterization of these enzymes in animals. However, the use of a bacterial PC-PLC antibody that cross-reacted with mammalian PC-PLC enabled the detection of 66 kDa PLC isoform in several cell types, such as mitogen-stimulated fibroblasts [174], synaptic endings [183], ovarian tumor [178], and breast cancer [179]. The inhibition of PC-PLC by tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609) in the presence or absence of basic fibroblast growth factor strongly decreases or stops the proliferation and differentiation induced in various cellular systems [177, 180, 184]. The competitive inhibitor D609 might be involved in the chelation of Zn²⁺ required for PC-PLC catalytic activity [184].

The activity of plant PC-PLC, also known as non-specific PLC (NPC), has been described in various organs and tissues [166]. Recent reports pointed a role of NPC in root development and brassinolide signaling [185], regulation of stress responses [186, 187] and abscisic acid sensing, and tolerance to hypersomnotic stress [188]. The analysis of the genome sequence of *Arabidopsis thaliana* revealed the presence of several genes coding for putative NPC (AtNPC1 to AtNPC6) proteins of 510–540 amino acid residues [166]. The high homology between AtNPCs and acid phosphatase proteins allowed the construction of a 3D model [189]. Catalytic site amino acid residues of the bacterial enzyme were shown to be conserved in the AtNPC 3D model, suggesting a general ping-pong mechanism in which the active site nucleophilic amino acid residue is covalently bound to the phosphate group of the substrate [166]. Recombinant AtNPC4 and AtNPC5 were shown to be active on PC and PE [190, 191], while recombinant AtNPC3 was shown to hydrolyze specifically lysolPA, producing monoacylglycerol [192]. D609, the specific inhibitor of bacterial and mammalian PC-PLCs, did not have any inhibitory effect on plant PC-PLC [166, 187], which is an indication that plant NPCs may have different regulatory properties from those of animal or bacterial PC-PLCs.

5.2 PI-PLCs

PI-PLCs are organized in multi-domains having molecular masses ranging from 85 to 150 kDa and have been identified in a broad spectrum of organisms including bacteria, yeasts, plants, and animals [165, 193, 194]. PI-PLCs catalyze the hydrolysis of the proximal phosphodiester bond of PI-4,5-bisphosphate (PIP₂), in a Ca²⁺-dependent manner, generating two second messengers:

1,2-diacylglycerol (DG) and inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). DG is a neutral lipid that remains in the membrane and activates PKC. IP_3 is a polar product that diffuses into the cytosol and controls the activity of a calcium channel located on an intracellular Ca^{2+} reservoir. Ca^{2+} thus released activated specific proteins (e.g., tropomyosin and calmodulin) which, in turn, activate specific processes (calcium- and calmodulin-dependent protein kinase, among others). The combined effects of metabolic pathways activated by DG and IP_3 lead to the final biological response [195]. The role as well as the mode of regulation of PI-PLCs in plant cell would be different than in animal cell for two reasons: the plant cell contains less IP_3 and does not contain a specific receptor for IP_3 [165]. Other soluble forms of PI-PLC products, namely, inositol tetrakisphosphate (IP_4), inositol pentakisphosphate (IP_5), and inositol hexakisphosphate (IP_6), have been shown to be equally important in various signaling pathways in plants [165]. Mammalian and plant PI-PLCs are distinct from bacterial PI-PLC that cannot hydrolyze phosphorylated phosphoinositides [196].

Currently, 13 members of PI-PLC enzymes have been characterized in mammals and classified into 6 distinct classes on the basis of amino acid sequence homology and domain structure: PI-PLC β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, and $\beta 4$), PI-PLC β - γ ($\gamma 1$ and $\gamma 2$), PI-PLC β - δ ($\delta 1$, $\delta 3$, and $\delta 4$), PI-PLC β - ϵ , PI-PLC β - ζ , and PI-PLC β - η ($\eta 1$ and $\eta 2$) [197]. Five conserved domains are found in almost all PLC isozymes: the pleckstrin homology domain (PH domain), the EF-handlike domain, X and Y catalytic domains, and the C2 domain [193, 197, 198]. Apart from these, other PLC subtype-specific domains also exist, such as SRC homology domains in PLC γ or Ras activation-related domains in PLC ϵ [199]. The catalytic domains X and Y are highly conserved across mammalian PLCs and often located between the C2 domain and the pattern EF. Their structure consisted of alternating α -helices and β -strands similar to an incomplete triose phosphate isomerase (TIM), α -/ β -barrel [200, 201]. The X and Y domains are usually separated by a linker region called Z-region which is poorly conserved, susceptible to proteolysis and not required for catalysis, suggesting a role in subtype-specific regulation [202]. The C2 domain, identified in a number of enzymes involved in signal transduction and/or phospholipid metabolism [203–205], is a basic element that often mediates the binding to phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner. The 3D structure of the C2 domain shows a β -sandwich structure with two β -sheets consisting of four antiparallel β -strands each [200, 201]. Three connecting loops form the Ca^{2+} -binding regions (CBR1, CBR2, and CBR3) referred as topology II in PI-PLC $\delta 1$ [200, 201]. The EF-hand consists of two α -helices and a loop directly responsible for the binding of the Ca^{2+} and consequently enhancing the PI-PLC enzymatic activity [206]. The binding of Ca^{2+} to PI-PLC proteins is strong only if

there are several EF-hand structures in the molecule, suggesting interaction between them. The PH domain has been identified in a range of proteins that possess roles in cell signaling and cytoskeletal function [207, 208]. Most PI-PLCs contain a single PH domain located in the N-terminal region and constituted by a seven-stranded β -sandwich and a C-terminal amphipathic α -helix [209]. This structure allows PH domain-containing proteins to bind phospholipids. Small variations between PH domains allow the selectivity toward a specific phospholipid. PH domains are not very conserved among PLCs, which suggests their association with a specific subtype regulation [202].

PI-PLC β isootypes are commonly regulated and activated by G protein-coupled receptors. This coupling of G proteins to PLC is required to generate an IP_3 / Ca^{2+} signal [210]. However, the specificity of individual β isoforms toward different receptor subtypes is still to be elucidated [202]. PI-PLC γ isoforms are regulated and activated by receptors that are coupled to tyrosine kinases through SH2 domain-phosphotyrosine interaction [211]. They can also be activated by various receptors lacking intrinsic tyrosine kinase activity, such as interleukin [212], angiotensin II [213], and bradykinin [214] receptors. PI-PLC ϵ isoforms are activated by G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinase systems with distinct regulatory mechanisms [215]. PI-PLC δ isoforms are activated by G protein-coupled receptors and involved in the amplification of Ca^{2+} responses initiated by other PI-PLCs or other mechanisms [202]. PI-PLC ζ has been described as sperm-specific protein involved in fertilization by triggering Ca^{2+} oscillations driven by the production of IP_3 in oocytes [216, 217]. PI-PLC η isoform is regulated by G protein $\beta\gamma$ subunits and has been proposed to be involved in developmental aspects of neuronal function [191, 218].

6 Phospholipase D

6.1 Enzymology and Pathophysiological Roles

In contrast to PLAs, PLA $_2$, and PLC, PLD hydrolyzes the distal phosphodiester bond of phospholipids. Through this reaction, PLD releases the headgroup of the substrate phospholipid and produces PA (Fig. 2a). In addition to the hydrolysis reaction, PLD is also able to catalyze the transphosphatidylatation reaction (Fig. 2a), which consists in the exchange of the headgroup of the substrate phospholipid to another headgroup, producing thus a new phospholipid [219]. This second reaction, which competes with hydrolysis, involves a primary alcohol that serves as a nucleophilic acceptor and that is transferred to the phosphatidyl residue, resulting in the formation of the corresponding phosphatidylalcohol.

Historically, PLD has been discovered in plants whose protein extracts present an important catalytic activity. Indeed, PLD activity

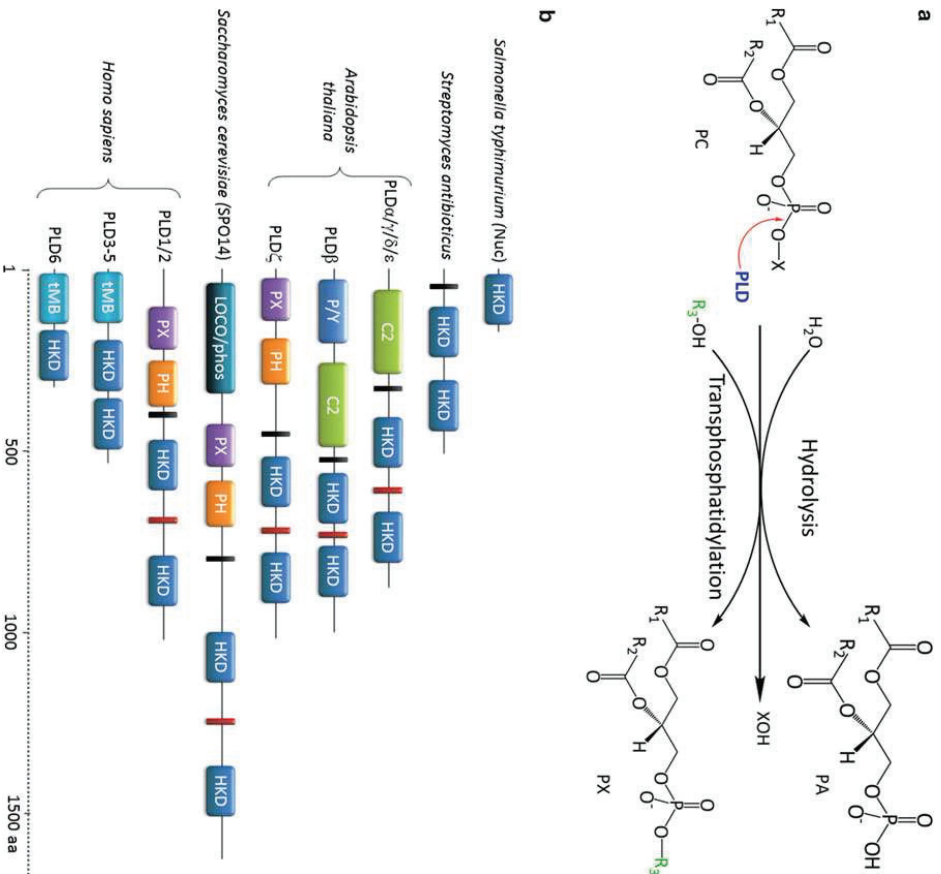


Fig. 2 (a) Schematic representation of the hydrolysis and transphosphatidylation reactions catalyzed by PLD. **XOH** Primary alcohol, **PX** Phosphatidylalcohol. **(b)** Schematic representation of the domains present in PLDs of bacteria (*Streptomyces antibioticus*), plant (*Arabidopsis thaliana*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), and mammal (*Homo sapiens*) and in the endonuclease Nuc (*Salmonella typhimurium*). Black and red boxes correspond, respectively, to conserved regions CRI and CRII; **C2** C2 domain, **PY** Proline and tyrosine rich domain, **PX** Plox domain, **PH** Pleckstrin homology domain, **LOCO/phos** Endosome-targeting domain, **MMB** Transmembrane domain

was described for the first time in carrot [220] and then used as a biocatalyst by several chemists for the synthesis of new phospholipids, using its transphosphatidylase activity [221]. In the 1990s, the purification and characterization of PLD took on a real scale

[222–224] leading to the first cloning of the PLD α gene from the plant *Ricinus communis* by Wang et al. [225]. This work was the beginning of the characterization of PLDs from other organisms, such as bacteria, yeasts, and viruses [226]. However, mammalian PLDs were subjected to the greatest interest, with the first cloning of the human *PLD1* gene in 1995 [227]. In humans and more generally in mammals, PLD appears to be a key enzyme of cell signaling, and its characterization represents a major issue, especially in human health.

This role of PLD is mainly attributed to the effects induced by PA, its reaction product, which is a lipid mediator involved in many cellular signaling pathways. Although PA is slightly present in cells, accounting only for 2–6% of membrane phospholipids in human cells [228, 229], this phospholipid is an essential lipid mediator that exhibits unique features, compared to other cell phospholipids. Indeed, since its headgroup is composed only of a hydrogen atom, bound to the phosphate group, PA presents the smallest headgroup. This feature confers to PA, a cone-shaped structure that spontaneously induces a negative curvature of the lipid bilayer, facilitating the events of fission and fusion of membranes [230].

In addition, PA is a negatively charged phospholipid that recruits to the membrane and regulates numerous signaling proteins [231]. Direct interactions may be explained by the formation of an intermolecular hydrogen bond between PA and the target protein, as described by the “electrostatic-hydrogen bond switch” model [232]. In this model, the target protein is initially recruited to the membrane via an electrostatic attraction to subsequently form a hydrogen bond between PA and a basic amino acid residue of the target protein. This phenomenon requires a distance of less than 3.5 Å between the side chain of the basic amino acid residue and the phosphate group and leads to a deprotonation of PA. As a result of this phenomenon, the side chain of the basic residue is locked with PA, strengthening the interaction.

Among proteins interacting with PA, a large number appears to be involved in key cellular signaling pathways, such as the mammalian target of rapamycin (mTOR) as well as the kinases Akt and Raf-1, involving PLD in cell growth, proliferation, and survival phenomenon [231]. Therefore, PLD has been shown to be associated with many pathologies, such as thrombosis [231], autoimmune [234], Alzheimer’s disease [235], as well as some inflammatory diseases, including acute pancreatitis [236], peritonitis [237], and brain ischemia [238]. In addition, aberrant PLD activity has also been associated with several types of cancer, such as breast [239], kidney [240], brain [241], colon [242], and lung [243] cancers, driving researchers to deepen the identification and characterization of PLDs.

So far, six putative PLD genes have been identified in humans [244]. Among these isoforms, both PLD1 and PLD2 present the

well-characterized phox (PX) and pleckstrin homology (PH)-regulating domains, located at their N-terminus (Fig. 2b). PLD1 which is activated by PKC α and PKC β isoforms, small G-proteins, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) has been reported to be associated with numerous diseases, including thrombotic disease [233], cancer [245], and autoimmunity [246]. The *PLD1* gene is subjected to an alternative splicing and codes for the two isoforms PLD1a (1074 residues) and PLD1b (1036 residues), which differ by the presence of internal regulating loop [247]. In contrast, PLD2 presents a more reduced length (933 residues). This isoform, which also requires PIP₂ for activation, is mainly located at the plasma membrane [226] and has been reported to be involved in membrane trafficking and numerous signaling pathways [226, 244]. Similarly to PLD1, PLD2 has been linked to cancer [237] but also to hypertension and Alzheimer's disease [244]. PLD3 and PLD4 isoforms were shown to be anchored in the membrane via a transmembrane domain [244] (Fig. 2b). Similarly, PLD5 presents a transmembrane domain but has not been characterized so far. In addition, this isoform presents non-conservative substitutions in its active site. Finally, PLD6 also known as MitroPLD is a dimeric protein located on the external membrane of the mitochondrial surface [248]. In contrast to all other human isoforms, PLD6 which has been cloned and purified [249] presents a transmembrane domain (Fig. 2b) and was shown to be involved in the biogenesis of Piv1-interacting RNAs (piRNAs) [244].

In contrast to humans, plants present a large number of PLD isoforms. So far, 12 putative PLD genes have been identified in the plant genetic model *Arabidopsis thaliana* [226, 250] and have been reported to play central roles in growth, biomass accumulation, seed germination, wound healing, stress, and defense [250, 251]. Based on their biochemical properties, their sequence similarities, and their gene architecture, these PLDs can be grouped into two major categories [226]. The C2-PLD category comprises ten PLD genes that harbor a C2 domain, subdivided into α -, β -, γ -, δ -, and ϵ -type PLDs (Fig. 2b). In contrast, the PX/PH-PLD category presents only two PLD genes that constitute the ζ -type and that contain a PX and a PH domain, similarly to human PLD1 and PLD2 (Fig. 2b). In vitro, α -type PLD from various plant sources has been shown to hydrolyze PC, PE, and PG in the presence of 20–100 nM of Ca²⁺ and detergents, at physiological pH [250, 252, 253]. The β -type PLD, composed of two isoforms, has been linked to the regulation of actin polymerization/depolymerization [226]. The γ -type PLD is composed of three isoforms and is involved in lipid modulation under aluminum stress [254]. PLD δ and PLD ϵ isoforms have been demonstrated to hydrolyze PC, PG, and N-acyl-PE in the presence of PIP₂ and 50 μ M of Ca²⁺, at a physiological pH [250]. Concerning the

δ -type PLD, two spliced variant isoforms have been identified so far and shown to be involved in defense signaling [251]. Similarly to β - and γ -type PLDs, δ -type PLD hydrolyzes PC in the presence of PIP₂ and 50–100 μ M of Ca²⁺ but is also stimulated by oleate [255]. PLDe was shown to promote plant growth by acting on nitrogen signaling, and its catalytic activity is dependent on the presence of detergents, Ca²⁺, oleate, and PIP₂ [256]. Finally, the ζ -type PLD, which constitutes the PX/PH-PLD category, is composed of two isoforms that have been proposed to be involved in phosphate recycling, vesicular trafficking, and root gravitropism [226].

Concerning yeast PLDs, Spo14 is undoubtedly the best characterized. This PLD is produced by *Saccharomyces cerevisiae* and is essential for meiosis and spore formation [257]. In sporulating cells, Spo14 is phosphorylated and is relocated within the cell upon nitrogen and glucose limitation, independently of the process of meiosis [257]. Among bacteria, PLDs belonging to the *Streptomyces* genus are the best characterized. Indeed, the recombinant expression and crystallization of PLDs from *Streptomyces* sp. strain PME (PDB entry: 1F01) [258] and *Streptomyces antibioticus* (PDB entry: 2ZE9 – unpublished) have enable the determination of their three-dimensional (3D) structure.

All the PLDs described above share the conserved HKD motif HXXK₄D (histidyl, lysyl, and aspartyl, X being any amino acid residue) (Fig. 2b) which is duplicated in most members of the family [226]. Therefore, the determination of the 3D structure of bacterial PLD enabled major advances in the understanding of the catalytic mechanism governing the HKD PLD family [259].

Indeed the PLD superfamily can be separated into two distinct groups. The first group is represented by the HKD family; the second group is represented by the non-HKD family that, unlike the first group, does not exhibit any sequence homology and is devoid of the typical HKD consensus sequence [226].

6.2 The HKD PLD Family

6.2.1 Distribution and Functions of HKD PLDs

The HKD family is very well characterized and is composed by PLDs from mammalian, plant, yeast, and bacterial origins. All the members share the conserved HKD motif, which is directly involved in catalysis. However, it should be noted that the HKD consensus is also found in non-PLD enzymes, such as cardiolipin synthase and PS synthase, which catalyze, respectively, the reactions of synthesis of cardiolipin and PS through transphosphatidylation [204]. In addition, this motif is also found in several endonucleases, including the endonuclease Nuc from *Salmonella typhimurium* [260], which hydrolyzes the phosphodiester bond of DNA instead of phospholipids as far as PLD is concerned.

6.2.2 Domain Architecture of HKD PLDs

All members of the HKD PLD family are generally composed of four conserved regions (CR), noted from CRI to CRIV [204], among which CRII and CRIV contain the first and the second HKD consensus, respectively (Fig. 2b), which need to join in front of one another, in order to form a functional catalytic site [261]. This condition appears essential for catalysis, as demonstrated by the co-expression of the N-terminal part of rat PLD1, which contains the first HKD motif (CRII), along with its C-terminal part, which contains the second HKD motif (CRIV). Indeed, while no activity could be detected during separate expressions, the co-expression of both N- and C-terminal parts restored the activity [262, 263]. Thus, regarding published PLD 3D structures, PLDs belonging to the HKD family would adopt a “horse saddle” conformation, which allows both HKD motifs to form a complete catalytic site, by gathering their catalytic residues. Indeed, this specific configuration can be observed on the 3D structure of the PLD from *Streptomyces* sp. strain PME (PDB entry: 1H01) [258], which presents a similar structure to the endonuclease Nuc [260]. The necessity of gathering both HKD motifs is also demonstrated with PLD6 that, similarly to Nuc, is active only in the form of dimer [248].

In contrast to CRII and CRIV, the two conserved regions CRI and CRIII (corresponding to black and red boxes, respectively in Fig. 2b) are not directly involved in catalysis. Anyway, these regions are essential, as demonstrated by the leucyl to aspartyl mutation in the CRI of the human PLD1, which results in a total loss of the activity [264]. The conserved region CRIII, also known as the “TYENQEF motif” is located between both HKD consensus (CRII and CRIV). This region can be found in plant and yeast PLDs as well as in human PLD1 and PLD2 but is absent in bacterial PLDs [264].

Similarly, in contrast to bacterial PLDs, most of eukaryotic PLDs present one or several additional domains, located at their N-terminus and involved in the regulation of the membrane binding and catalysis (Fig. 2b). Thus, the presence of both PX and PH domains can be observed in human PLD1 and PLD2, in Spo14 as well as in plant ζ -type PLDs, while a C2 domain is present in most plant PLDs [226]. The 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.

Although PX, PH, and C2 domains are involved in membrane-binding phenomenon, some other domains, such as the LOCO/phos domain of Spo14 or the P/Y domain of plant PLD β (Fig. 2b), are involved in other biological functions. Indeed, the LOCO/phos domain is a highly phosphorylated region that is involved in the cellular location of Spo14 by regulating its translocation to endosomal membranes, during meiosis [257]. In contrast, the

6.3 The Non-HKD PLD Family

P/Y domain is only present in β -type of plant PLDs and has still no defined function, even if it was demonstrated to bind the 14-3-3 ω regulatory protein [265, 266].

In contrast to PLDs belonging to the HKD family, members of the non-HKD family do not present any sequence homology. Anyway, this family comprises numerous PLDs, from both eukaryotic and prokaryotic origins, that appear as important as the members of the HKD PLD family. This family comprises numerous secreted PLDs, which generally serves as a virulence factor. PLD from *Streptomyces chromoflavescens* (ScPLD) is probably one of the best characterized non-HKD PLD and has been proposed to be involved in extracellular phosphate scavenging [267]. When it is pure and concentrated, ScPLD presents a purple color which is due to the presence of Fe^{3+} in its active site [268]. This role of virulence factor is also found in the brown confined spider (*Laxoscelus reclusa*), which expresses a PLD-like sphingomyelinase D in its venom. This PLD is a powerful virulence factor involved in the strong inflammatory reaction in the bite site dermis, via the platelet aggregation caused by lysolPA [269, 270].

In human, several non-HKD PLDs have also been identified and cloned, such as the glycosylphosphatidylinositol-PLD (GPI-PLD), which hydrolyzes the GPI anchor of numerous membrane-associated proteins, by generating PA [226]. Concerning the N-acyl-PE-PLD (NAPE-PLD) which hydrolyzes NAPE to generate PA and N-acyl ethanolamine, it plays an important role in the synthesis of endocannabinoids, N-acyl ethanolamine being the precursor of anandamide [271]. The resolution of its 3D structure in 2015 has allowed to reveal its catalysis mechanism [272]. Thus, to be active, NAPE-PLD requires the presence of two zinc atoms which interact with the NAPE but also with three histidyl residues and an aspartyl residue of the catalytic site [272]. Finally, the autotaxin (ATX) is a lyso-PLD which hydrolyzes lysophospholipids such as the lysoPC to produce lysolPA [273]. Its 3D structure has been solved for the first time in 2011 [274] but is still the object of numerous structural characterizations, in particular for the design of inhibitors against arthritis [275].

6.4 Concluding Remarks

Current research mainly focuses on the HKD-type PLD because of its growing involvement in major pathologies as described above. However, numerous difficulties are encountered when studying human PLD. This is due to a complex activation mechanism, a weak catalytic activity mostly assayed by radioactivity, a poor expression level even in recombinant overexpression system, and a low solubility and stability when purified. All these aspects render typical fundamental biochemical investigations and proper enzymatic or structural studies challenging. Regarding the NCBI database,

most of the papers recently published on this field deal with the human enzyme. Nevertheless, a good proportion deals with plant PLDs. Indeed, the latter seems to be the most popular tool to study the HKD-type PLD as these eukaryotic enzymes are soluble and easily purified and share the same catalytic HKD motif. Plant PLDs seem perfectly accurate to screen conserved region (CR) inhibitors and conserved region enzymatic properties or to solve the 3D structure of the eukaryotic PLD. Interestingly, plant PLDs have been the port of entry of all research on the subject. They remain, from our perspective, the most promising way to understand the complex PLD superfamily.

References

- Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ (2004) Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem Int Ed Engl* 43 (45):6032–6040. <https://doi.org/10.1002/anie.200460416>
- De Maria L, Vind J, Oxenboll KM, Svendsen A, Parkar S (2007) Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(2):290–300. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0775-x>
- Kazlauskas RJ (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 9(2):195–201. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.008>
- Lands WE (1960) Metabolism of glycerolipids. 2. The enzymatic acylation of lysolipids. *J Biol Chem* 235:2233–2237
- Richmond GS, Smith TK (2011) Phospholipase A(1). *Int J Mol Sci* 12(1):588–612. <https://doi.org/10.3390/ijms12010588>
- Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J (2004) Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 73:321–354. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073731>
- Shimura K, Ohnishi M, Iwoda S, Gotoh N, Koizumi N, Watanabe H (2009) The hemolytic and cytolytic activities of Serratia marcescens phospholipase A (PhaA) depend on lysophospholipid production by PhaA. *BMC Microbiol* 9:261. <https://doi.org/10.1186/1471-2186-9-261>
- Schnitl DH, Wagar E, Karanmou L, Wecks D, Miller VL (1998) Phospholipase A of *Xerisia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect Immun* 66 (8):3941–3951
- Aoki J, Inoue A, Makide K, Saiki N, Arai H (2007) Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89(2):197–204. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.021>
- Sato T, Aoki J, Nagai Y, Dolhac N, Takio K, Doi T, Arai H, Inoue K (1997). Serrine phospholipid-specific phospholipase A that is secreted from activated platelets: A new member of the lipase family. *J Biol Chem* 272 (4):2192–2198
- Hiramatsu T, Sonoda H, Takanezawa Y, Morikawa R, Ishida M, Kasahara K, Sanai Y, Taguchi R, Aoki J, Arai H (2003) Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. *J Biol Chem* 278(49):49438–49447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M231018200>
- Agarwal S, Kim H, Chan RB, Agarwal S, Williams R, Cho W, Di Paolo G, Satchell KJF (2015) Autophagy and endosomal trafficking inhibition by Vibrio cholerae MARTX toxin phosphatidylinositol-3-phosphatase-specific phospholipase A1 activity. *Nat Commun* 6:8745. <https://doi.org/10.1038/ncomms9745>
- King TP, Kochoumian L, Joslin A (1984) Wasp venom proteins: phospholipase A1 and B. *Arch Biochem Biophys* 230(1):1–12. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90080-8)
- Perez-Riverol A, Campos Pereira FD, Musacchio Lasa A, Komani Ferrandis LG, Santos-Pinto JR, Justo-Iacomini DL, Oliveira de Azevedo G, Bazon ML, Palma MS, Zollner RL, Brochero-Braga MR (2016) Molecular cloning, expression and IgE-immunoreactivity of phospholipase A1, a major allergen from *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) venom. *Toxicon* 124:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.006>
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okeda K (2001) The DEPECTIVE IN ANOTHER 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. *Plant Cell* 13(10):2191–2209
- Noiriell A, Benveniste P, Banaas A, Stryme S, Bouvier-Nave P (2004) Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from Arabidopsis thaliana. *Eur J Biochem* 271 (18):3752–3764. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04317.x>
- Wang K, Froehlich JE, Zienkiewicz A, Hersh HL, Benning C (2017) A plastid phosphatidylglycerol lipase contributes to the export of acyl groups from plastids for seed oil biosynthesis. *Plant Cell* 29:1678–1696. <https://doi.org/10.1105/pc.17.00397>
- Carrierre F, Withers-Martinez C, van Tilbeurgh H, Roussel A, Cambillan C, Verger R (1998) Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochim Biophys Acta* 1376 (3):417–432
- Withers-Martinez C, Carrierre F, Verger R, Bourguier D, Cambillan C (1996) A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity: crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig. *Structure* 4(11):1363–1374
- Amara S, Delorme V, Record M, Carrierre F (2012) Inhibition of phospholipase A1, lipase and galactolipase activities of pancreatic lipase-related protein 2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP). *Biochim Biophys Acta* 1821(11):1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.014>
- Aloulou A, Frikha F, Noiriell A, Bou Ali M, Aboonashlam A (2013) Kinetic and structural characterization of triacylglycerol lipases possessing phospholipase A1 activity. *Biochim Biophys Acta* 1841(4):581–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.009>
- Simons JW, Gotz F, Egnmond MR, Verheij HM (1998) Biochemical properties of staphylococcal (phospho)lipases. *Chem Phys Lipids* 93(1-2):27–37
- Tseisinga JJ, van Pouderoeyen G, Nardini M, Ranasac S, Dijkstra BW (2007) Structural basis of phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *J Mol Biol* 371(2):447–456. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.041>
- Burke JE, Dennis EA (2009) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50(Suppl):S237–S242. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-1LR200>
- Burke JE, Dennis EA (2009) Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* 23 (1):49–59. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>
- Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K (2011) Recent progress in phospholipase A2 research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 50 (2):152–192. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.12.001>
- Rivera R, Chun J (2008) Biological effects of lysophospholipids. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 160:25–46. https://doi.org/10.1007/112_0507
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti Y, Kokorot G (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 111 (7):1248–1261. <https://doi.org/10.1021/cr2000085w>
- Schaloske RH, Dennis EA (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761 (11):1246–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>
- Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y (2015) A new era of secreted phospholipase A2. *J Lipid Res* 56 (7):1248–1261. <https://doi.org/10.1194/jlr.R058123>
- Lambeau G, Gelb MH (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 77:495–520. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.062405.154f007>
- Rouanet M, Bollinger JG, Lazdunski M, Gelb MH, Lambeau G (2003) Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity. *Biochemistry* 42 (39):11494–11503. <https://doi.org/10.1021/bi0349930>
- Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G (2000) Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme. *J Biol Chem* 275(11):7492–7496
- Pan YH, Yu BZ, Singer AG, Ghomashchi F, Lambeau G, Gelb MH, Jan MK, Bahson B (2002) Crystal structure of human group X secreted phospholipase A2. Electrostatically neutral interfacial surface targets zwitterionic membranes. *J Biol Chem* 277 (32):29,086–29,093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202531200>

35. Edwards SH, Thompson D, Baker SF, Wood SP, Wilton DC (2002) The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry* 41 (52):15468–15476
36. Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadleir M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem* 277(50):48,535–48,549. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205855200>
37. Nevalainen TJ, Graham GG, Scott KE (2008) Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim Biophys Acta* 1781(1–2):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.12.001>
38. Scott DL, White SP, Browning JL, Rosa JJ, Gelb MH, Sigler PB (1991) Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A2 from inflammatory exudate. *Science* 254 (5034):1007–1010
39. Mitsuishi M, Masuda S, Kudo I, Murakami M (2007) Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim Biophys Acta* 1771(11):1389–1396. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.09.006>
40. Przaniski W, Lambeau I, Lazdunsky M, Cho W, Kopylov J, Kulskis A (2005) Differential hydrolysis of molecular species of lipoprotein phosphatidylcholine by groups IIA, V and X secretory phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta* 1736(1):38–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.07.005>
41. Jemel I, Ji H, Oslund RC, Payne C, Dabert-Gay AS, Dougret D, Charqui K, Scazzello S, Gelb MH, Lambeau G (2011) Group X secreted phospholipase A2 proenzyme is matured by a furin-like proprotein convertase and releases arachidonic acid inside of human HEK293 cells. *J Biol Chem* 286 (42):36,509–36,521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.268540>
42. Murakami M, Taketomi Y, Mihi Y, Sato H, Yamamoto K, Lambeau G (2014) Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: the 3rd edition. *Biochimie* 107 (Pt A):105–113. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.003>
43. Murakami M, Taketomi Y, Girard C, Yamamoto K, Lambeau G (2010) Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* 92(6):561–582. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.015>
44. Ni Z, Okley NM, Smart BP, Gelb MH (2006) Intracellular actions of group IIA secreted phospholipase A2 and group IVA cytosolic phospholipase A2 contribute to arachidonic acid release and prostaglandin production in rat gastric mucosal cells and transgenic human embryonic kidney cells. *J Biol Chem* 281(24):16,245–16,255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513874200>
45. Mounier CM, Ghomashchi F, Lindsay MR, James S, Singer AG, Parrott RG, Gelb MH (2004) Arachidonic acid release from mammalian cells transgenic with human groups IIA and X secreted phospholipase A2 occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A2- α . *J Biol Chem* 279 (24):25,024–25,038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313019200>
46. Bezzine S, Koduri RS, Valentin E, Murakami M, Kudo I, Ghomashchi F, Sadleir M, Lambeau G, Gelb MH (2000) Exogenously added human group X secreted phospholipase A2, but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *J Biol Chem* 275(5):3179–3191
47. Koduri RS, Gronroos JO, Laine VI, Le Calvez C, Lambeau G, Nevalainen TJ, Gelb MH (2002) Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem* 277(8):5849–5857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109699200>
48. Webb NR (2005) Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 16(3):341–344
49. Munoz NM, Meliton AY, Meliton LN, Dudek SM, Left AR (2009) Secretory group V phospholipase A2 regulates acute lung injury and neutrophilic inflammation caused by LPS in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296(6):1879–1887. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90580.2008>
50. Boiland F, Lai Y, Larabee K, Balesstrieri B, Ghomashchi F, Fujitoka D, Gobzevic R, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Thornhill TS, Dvrangachi M, Renold H, Lambeau G, Gelb MH, Amn JP, Lee DM (2010) A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol Med* 2(5):172–187. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000072>
51. Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC (2006) Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res* 45 (6):487–510. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.05.003>
52. Leslie CC (2015) Cytosolic phospholipase A (2): physiological function and role in disease. *J Lipid Res* 56(8):1386–1402. <https://doi.org/10.1194/jlr.R057588>
53. Ohno T, Uozumi N, Hirabayashi T, Shimizu T (2005) Identification of novel cytosolic phospholipase A2(s), murine cPLA2 (delta), (epsilon), and (zeta), which form a gene cluster with cPLA2(beta). *J Biol Chem* 280(26):24,576–24,583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413711200>
54. Ghomashchi F, Nalka GS, Bollinger JG, Aloulou A, Lehr M, Leslie CC, Gelb MH (2010) Interfacial kinetic and binding properties of mammalian group IVB phospholipase A2 (cPLA2beta) and comparison with the other cPLA2 isoforms. *J Biol Chem* 285 (46):36,100–36,111. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165647>
55. Ghosh M, Loper R, Gelb MH, Leslie CC (2006) Identification of the expressed form of human cytosolic phospholipase A2beta (cPLA2beta): cPLA2beta3 is a novel variant localized to mitochondria and early endosomes. *J Biol Chem* 281 (24):16,615–16,624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601770200>
56. Ghosh M, Loper R, Ghomashchi F, Tucker DE, Bonventre JY, Gelb MH, Leslie CC (2007) Function, activity, and membrane targeting of cytosolic phospholipase A2(zeta) in mouse lung fibroblasts. *J Biol Chem* 282 (16):11,676–11,686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608458200>
57. Norris PC, Gosselin D, Reichart D, Glass CK, Dennis EA (2014) Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammation activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(35):12,746–12,751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404372111>
58. Leslie CC (2004) Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem Cell Biol* 82(1):1–17. <https://doi.org/10.1139/0603-0800-03-080>
59. Leslie CC (2004) Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 70(4):373–376. <https://doi.org/10.1016/j.plfa.2003.12.012>
60. Bickford JS, Beachy DE, Newson KJ, Bartolovits SJ, Herlihy JD, Qiu X, Walters JN, Li N, Nick HS (2013) A distal enhancer controls cytokine-dependent human cPLA2alpha gene expression. *J Lipid Res* 54 (7):1915–1926. <https://doi.org/10.1194/jlr.M037382>
61. Lee CW, Jin CC, Lee IT, Lee HC, Yang CM (2011) Activation and induction of cytosolic phospholipase A2 by TNF- α mediated through Nox2, MAPKs, NF- κ B, and p300 in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 226(8):2103–2114. <https://doi.org/10.1002/jcp.22537>
62. Leslie CC, Gangelhoff TA, Gelb MH (2010) Localization and function of cytosolic phospholipase A2alpha at the Golgi. *Biochimie* 92 (6):620–626. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.001>
63. Evans JH, Spencer DM, Zwielfach A, Leslie CC (2001) Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem* 276(32):30,150–30,160. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100943200>
64. Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T (2004) Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol Pharm Bull* 27(8):1168–1173. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1168>
65. Persic O, Paterson HF, Mosedale G, Lara-Gonzalez S, Williams RL (1999) Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 274 (21):14,979–14,987
66. Ball A, Nielsen R, Gelb MH, Robinson BH (1999) Interfacial membrane docking of cytosolic phospholipase A2 C2 domain using electrostatic potential-modulated spin relaxation magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12):6637–6642
67. Nalefski EA, Szlaza MM, Falke JJ (1997) Ca²⁺-signaling cycle of a membrane-docking C2 domain. *Biochemistry* 36 (40):12,011–12,018. <https://doi.org/10.1021/bi9717340>
68. Evans JH, Gerber SH, Murray D, Leslie CC (2004) The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell* 15(1):371–383. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-05-0338>
69. Evans JH, Murray D, Leslie CC, Falke JJ (2006) Specific translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane requires both Ca²⁺ and PI2 γ recognition by its C2 domain. *Mol Biol Cell* 17(1):56–66. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-06-0499>
70. Burke JE, Hsu YH, Deems RA, Li S, Woods VL Jr, Dennis EA (2008) A phospholipid

- substrate molecule residing in the membrane surface mediates opening of the lid region in group IVA cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 283(45):31,227-31,236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804492200>
71. Evans JH, Leslie CC (2004) The cytosolic phospholipase A2 catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes. *J Biol Chem* 279(7):6005-6016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311246200>
72. Pavicic Z, Leslie CC, Malik KU (2008) cPLA2 phosphorylation at serine-515 and serine-505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *J Lipid Res* 49(4):724-737. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700419-JLR200>
73. Tucker DE, Ghosh M, Ghomashchi F, Loper R, Suram S, John BS, Gironi M, Bolinger G, Gelb MH, Leslie CC (2009) Role of phosphorylation and basic residues in the catalytic domain of cytosolic phospholipase A2alpha in regulating interfacial kinetics and binding and cellular function. *J Biol Chem* 284(14):9596-9611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807299200>
74. Das S, Raffter JD, Kim KP, Gygi SP, Cho W (2003) Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278(42):41431-41442
75. Casas J, Gilon MA, Virgo AG, Crespo MS, Balsinde J, Balboa MA (2006) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A2 to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol Biol Cell* 17(1):155-162. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-06-0545>
76. Dessan A (2000) Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1488(1-2):40-47. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00108-6](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00108-6)
77. Rubin BB, Downey GP, Koh A, Degousse N, Ghomashchi F, Nalain L, Stefanski E, Harkin DW, Sun C, Smart BP, Lindsay TP, Cherepanov V, Yachon E, Kohn D, Sadilek M, Brown GE, Yaffe MB, Plumb J, Grinstein S, Glogauer M, Gelb MH (2005) Cytosolic phospholipase A2-alpha is necessary for platelet-activating factor biosynthesis, efficient neutrophil-mediated bacterial killings, and the innate immune response to pulmonary infection: cPLA2-alpha does not regulate neutrophil NADPH oxidase activity. *J Biol Chem* 280(9):7519-7529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407438200>
78. Downey P, Sapirstein A, O'Leary E, Sun TX, Brown D, Bonventre JV (2001) Renal concentrating defect in mice lacking group IV cytosolic phospholipase A2. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(4):F607-F618
79. Wong DA, Kita Y, Uozumi N, Shimizu T (2002) Discrete role for cytosolic phospholipase A2(alpha) in platelets: studies using single and double mutant mice of cytosolic and group IIA secretory phospholipase A2. *J Exp Med* 196(3):349-357
80. Reed KA, Tucker DE, Aljouli A, Adler D, Ghomashchi F, Gelb MH, Leslie CC, Oates JA, Bonventre O (2011) Functional characterization of mutations in inherited human cPLA(2) deficiency. *Biochemistry* 50(10):1731-1738. <https://doi.org/10.1021/bi101877n>
81. Brooke MA, Longhurst HJ, Pagnoul V, Kirkby NS, Mitchell JA, Rutschendorf E, Warner TD, Kelsell DP, MacDonald TT (2014) Cryptogenic multifocal ulcerating stenosing enteritis associated with homozygous deletion mutations in cytosolic phospholipase A2-alpha. *Gut* 63(1):96-104. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303581>
82. Fatoni EM, Razzari C, Zulucra A, Femia EA, Fenu L, Trinchera M, Poddà GM, Pugliano M, Marongiu F, Cattaneo M (2014) Bleeding diathesis and gastroduodenal ulcers in inherited cytosolic phospholipase-A2 alpha deficiency. *Thromb Haemostasis* 112(6):1182-1189. <https://doi.org/10.11160/TH14-04-0352>
83. Adler DH, Cogan JD, Phillips JA 3rd, Schmez-Boutaud N, Milne GL, Iverson T, Stein JA, Brenner DA, Morrow JD, Bouvard O, Oates JA (2008) Inherited human cPLA(2alpha) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction. *J Clin Invest* 118(6):2121-2131. <https://doi.org/10.1172/JCI30473>
84. Haq S, Kilzer H, Michael A, Tao J, O'Leary E, Sun XM, Walters B, Bhatnagar K, Chen X, Cui L, Andreucci M, Rosenzweig A, Guerrero JL, Patten R, Liao R, Molkentin J, Pland M, Bonventre JV, Force T (2003) Deletion of cytosolic phospholipase A2 promotes striated muscle growth. *Nat Med* 9(7):944-951. <https://doi.org/10.1038/nm891>
85. Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, Shimizu T (2002) A pivotal role of cytosolic phospholipase A2 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nat Med* 8(5):480-484. <https://doi.org/10.1038/nm0502-480>
86. Miyaura C, Inada M, Matsumoto C, Ohshiba T, Uozumi N, Shimizu T, Ito A (2003) An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. *J Exp Med* 197(10):1303-1310. <https://doi.org/10.1084/jem.20030015>
87. Heigen M, Sun L, Uozumi N, Kame K, Goad ME, Nickerson-Nutter CL, Shimizu T, Clark JD (2003) Cytosolic phospholipase A2alpha deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 197(10):1297-1302. <https://doi.org/10.1084/jem.20030016>
88. Bonventre J (2004) Cytosolic phospholipase A2alpha reigns supreme in arthritis and bone resorption. *Trends Immunol* 25(3):116-119
89. Sanchez-Mejia RO, Newman JW, Toh S, Yu GQ, Zhou Y, Halabisky B, Cisse M, Secarce-Letic K, Cheng IH, Gan L, Palop JJ, Bonventre JV, Mutsche L (2008) Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 11(11):1311-1318. <https://doi.org/10.1038/nm.2213>
90. Hartreey JM, Coggins KG, Tilley SL, Jania LA, Lovgren AK, Audoly IP, Keller BH (2006) Prostaglandin E2 protects lower airways against bronchoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(1):L105-L113. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00221.2005>
91. Francois H, Athirakul K, Howell D, Dash R, Mao L, Kim HS, Rodman HA, Fitzgerald GA, Keller BH, Coffman TM (2005) Prostaglandin protects against elevated blood pressure and cardiac fibrosis. *Cell Metab* 2(3):201-207. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.08.005>
92. Irlsey JN, Nakamishi M, Elynn C, Belinsky CS, De Guise S, Adib JN, Dobrowsky RT, Bonventre JV, Rosenberg DW (2005) Cytosolic phospholipase A2 deletion enhances colon tumorigenesis. *Cancer Res* 65(7):2636-2643. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3446>
93. Meyer AM, Dwyer-Nield LD, Hurreau GJ, Keith RL, O'Leary E, You M, Bonventre JV, Nemenoff RA, Malkinson AM (2004) Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2. *Carcinogenesis* 25(8):1517-1524. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh150>
94. Ramanadham S, Ali T, Ashley JW, Bone RN, Hancock WD, Lei X (2015) Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in biological processes and diseases. *J Lipid Res* 56(9):1643-1668. <https://doi.org/10.1194/jlr.R058701>
95. Dennis EA (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 22(1):1-2. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)20031-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)20031-3)
96. Kienzberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R (2009) Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 50(Suppl):S63-S68. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800082-JLR200>
97. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commins SA, Crowther DJ (2006) Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 47(9):1940-1949. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600185-JLR200>
98. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279(47):48,968-48,975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407841200>
99. Luo YC, Dennis EA (1998) Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Gα2+-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1392(2-3):320-332
100. Jenkins CM, Yan W, Mancuso DJ, Gross RW (2006) Highly selective hydrolysis of fatty acyl-CoAs by calcium-independent phospholipase A2beta. Enzyme autoacylation and acyl-CoA-mediated reversal of calmodulin inhibition of phospholipase A2 activity. *J Biol Chem* 281(23):15,615-15,624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511623200>
101. Carper MJ, Zhang S, Turk J, Ramanadham S (2008) Skeletal muscle group VIIA phospholipase A2 (pPLA2beta): expression and role in fatty acid oxidation. *Biochemistry* 47(46):12,241-12,249. <https://doi.org/10.1021/bi800923s>
102. Hermanson M, Häminnen S, Holkner K, Somerharju P (2016) The PNPLA-family phospholipases involved in glycerophospholipid homeostasis of HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1861:1058-1065. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.06.007>
103. Wilkins WP 3rd, Barbour SE (2008) Group VII phospholipases A2: homeostatic phospholipases with significant potential as targets for novel therapeutics. *Curr Drug Targets* 9(8):683-697

104. Ferooqui AA, Ong WY, Horrocks LA (2006) Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 58 (3):591–620. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.7>
105. Hooks SB, Cummings BS (2008) Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in cell growth and signaling. *Biochem Pharmacol* 76(9):1059–1067. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.044>
106. Scott KF, Sajirowic M, Hein J, Nixdorf S, Galatis P, Lauw W, de Souza P, Dong Q, Grahm GG, Russell PJ (2010) Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. *Biochimie* 92(6):601–610. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.019>
107. Akiba S, Sato T (2004) Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. *Biol Pharm Bull* 27(8):1174–1178. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1174>
108. Balsinde J, Balboa MA (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* 17 (9):1052–1062. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.002>
109. Gross RW, Ramanadham S, Kruszka KK, Han X, Turk J (1993) Rat and human pancreatic islet cells contain a calcium ion independent phospholipase A2 activity selective for hydrolysis of arachidonate which is stimulated by adenosine triphosphate and is specifically localized to islet beta-cells. *Biochemistry* 32 (1):327–336
110. Song H, Bao S, Lei X, Jin C, Zhang S, Turk J, Ramanadham S (2010) Evidence for proteolytic processing and stimulated organelle redistribution of tPLA2beta. *Biochim Biophys Acta* 1801(5):547–558. <https://doi.org/10.1016/j.bbalp.2010.01.006>
111. Baik YY, Song H, Baek SH, Park BY, Kim H, Ryu SH, Suh FG (1998) Localization of two forms of phospholipase C-beta1, a and b, in C6B1-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1389 (1):76–80. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00128-8)
112. Assumi G, Tajima M, Haidano A, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I (1998) Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *J Biol Chem* 273 (22):13,870–13,877
113. Sharma J, Turk J, McHewer J (2010) Endothelial cell prostaglandin I(2) and platelet-activating factor production are markedly attenuated in the calcium-independent phospholipase A2beta knockout mouse. *Biochemistry* 49(26):5473–5481. <https://doi.org/10.1021/bi100752u>
114. Yan W, Jenkins CM, Han X, Mancuso DJ, Sims HF, Yang K, Gross RW (2005) The highly selective production of 2-arachidonoyl lysophosphatidylcholine catalyzed by purified calcium-independent phospholipase A2gamma: identification of a novel enzymatic mediator for the generation of a key branch point intermediate in eicosanoid signaling. *J Biol Chem* 280 (29):26,669–26,679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502358200>
115. Saunders CJ, Moon SH, Liu X, Thiffault J, Coffman K, LeFevron JB, Taboada E, Smith LD, Farrow EG, Miller N, Gibson M, Patterson M, Kingsmore SF, Gross RW (2015) Loss of function variants in human PNPLA8 encoding calcium-independent phospholipase A2 gamma recapitulate the mitochondrialopathy of the homologous null mouse. *Hum Mutat* 36(3):301–306. <https://doi.org/10.1002/humu.22743>
116. Mancuso DJ, Kotzbauer P, Wozniak DF, Sims HE, Jenkins CM, Guan S, Han X, Yang K, Sun G, Malik J, Conyers S, Green RG, Schmidt RE, Gross RW (2009) Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2gamma leads to alterations in hippocampal cardiolipin content and molecular species distribution, mitochondrial degeneration, autophagy, and cognitive dysfunction. *J Biol Chem* 284(51):35,632–35,644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.055194>
117. van Tienhoven M, Atkins J, Li Y, Glynn P (2002) Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids. *J Biol Chem* 277(23):20,942–20,948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M2000330200>
118. Baulande S, Lasnier E, Lucas M, Parault J (2001) Adiponitrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA, specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 276 (36):33,336–33,344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105193200>
119. Akassoglou K, Maleser B, Xu J, Tessarollo L, Rosenbluth J, Chao MV (2004) Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (14):5075–5080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401030101>
120. He S, McPhaul G, Li Z, Garni R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH (2010) A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285(9):6706–6715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064501>
121. Channoun Z, Vacca E, Patton RG, Gruenbergl J (2013) PNPLA3/adiponitrin functions in lipid droplet formation. *Biol Cell* 105 (5):219–233. <https://doi.org/10.1111/boc.201200036>
122. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH (2011) Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 286(43):37,085–37,093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290114>
123. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraru C, Paar M, Comnacu I, Rangrez AY, Wongsiriroj N, Nagy HM, Ivanova PT, Scott SA, Knittelfelder O, Recheberger GN, Birner-Gruenberger R, Eder S, Brown HA, Haemmerle G, Oberer M, Lass A, Kerschav BE, Zimmermann R, Zechner R (2012) Adiponitrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab* 15(5):691–702. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.008>
124. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3 (5):309–319. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.005>
125. Yamaguchi T, Osuni T (2009) Chanarin-Dorfman syndrome: deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase. *Biochim Biophys Acta* 1791(6):519–523. <https://doi.org/10.1016/j.bbalp.2008.10.012>
126. Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Mameda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi T (2013) Downregulation of adipose triglyceride lipase in the heart aggravates diabetic cardiomyopathy in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 438(1):224–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.063>
127. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Mair R, Thewissen C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoeller G, Zechner R (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312(5774):734–737. <https://doi.org/10.1126/science.1123965>
128. Afaki E, Doddappattar P, Radovic B, Povoden S, Kolb D, Vujic N, Wegscheider M, Koefeler H, Hornemann T, Gräter WF, Malli R, Madeo F, Kratky D (2012) C16 ceramide is crucial for triacylglycerol-induced apoptosis in macrophages. *Cell Death Dis* 3:e280. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.17>
129. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Consens LS, Zimmerman GA et al (1995) Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 374(6522):549–553. <https://doi.org/10.1038/374549a0>
130. Samarra U, Bannison BJ (2008) Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: structural implication to lipoprotein binding and catalysis. *J Biol Chem* 283(46):31,617–31,624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804750200>
131. Tsimikas S, Tsirois LD, Tselis AD (2007) New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (10):2094–2099. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000280571.28102.d4>
132. Macphree CH, Nelson JJ, Zaleski A (2005) Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a target of therapy. *Curr Opin Lipidol* 16 (4):442–446
133. Min JH, Jain MK, Wilder C, Paul L, Apriz-Castro R, Asplack DC, Gelb MH (1999) Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase. *Biochemistry* 38:12,935–12,942 (0006-2960 (Print))
134. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, Vartus D, McIntyre TM, Gray PV, Young SG, Prescott SM (1999) Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J Biol Chem* 274 (11):7018–7024
135. Gardner AA, Reichert EC, Toppan MK, Stafforini DM (2008) Identification of a domain that mediates association of platelet-activating factor acetylhydrolase with high density lipoprotein. *J Biol Chem* 283:17,099–17,106 (0021-9258 (Print))
136. McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM (2009) The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J Lipid Res* 50:5255–5259 (0022-2275 (Print))
137. McCullough PA (2009) Dapagliflozin and atherosclerotic plaque: should lipoprotein-

- associated phospholipase A2 be a therapeutic target? *Curr Atheroscler Rep* 11(5):334-337
138. Serruys PW, Garcia-Garcia HM, Buszman P, Erne P, Verheye S, Aschermann M, Duckers H, Biele O, Dudek D, Botker HE, von Birgelten C, D'Amico D, Hutchinson T, Zambiani A, Mastik F, van Es GA, van der Steen AF, Vince DG, Ganz P, Hamm CW, Wijns W, Zalewska A (2008) Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 118(11):1172-1182. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771899>
139. Wilensky RL, Shi Y, Mohler ER 3rd, Hamandzic D, Burger ME, Li J, Postle A, Fennig RS, Bollinger JG, Hoffman BE, Pelchovitz DJ, Yang J, Miranville RC, Webb CL, Zhang L, Zhang P, Gelb MH, Walker MC, Zaleski A, Maepiche CH (2008) Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat Med* 14(10):1059-1066. <https://doi.org/10.1038/nm.1870>
140. Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsuue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H (2008) Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *J Biol Chem* 283(3):1628-1636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708622200>
141. Manya H, Aoki J, Watanabe M, Adachi T, Asou H, Inoue Y, Arai H, Inoue K (1998) Switching of platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain. *J Biol Chem* 273(29):18,567-18,572
142. Katsoulis E, Nakos G, Lekka ME (2009) Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1792(10):941-953. <https://doi.org/10.1016/j.bbaddis.2009.06.007>
143. Kim TS, Sundaresch CS, Feinstein SL, Dodiya C, Skech WR, Jain MK, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Nomura N, Fisher AB (1997) Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca2+-independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. *J Biol Chem* 272(4):2542-2550
144. Chen JW, Dodiya C, Feinstein SL, Jain MK, Fisher AB (2000) 1-Cys peroxidoredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* 275(37):28,421-28,427. <https://doi.org/10.1074/jbc.M1005073200>
145. Bridges JP, Ikegami M, Brilla LL, Chen X, Mason RJ, Shannon JM (2010) LPCAT1 regulates surfactant phospholipid synthesis and is required for transitioning to air breathing in mice. *J Clin Invest* 120(5):1736-1748. <https://doi.org/10.1172/JCI38061>
146. Hiraoka M, Abe A, Lu Y, Yang K, Han X, Gross RW, Shapiro JA (2006) Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol Cell Biol* 26(16):6139-6148. <https://doi.org/10.1128/MCB.00627-06>
147. Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Jaworski K, Ahmadian M, Sul HS (2008) Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (ADPLA). *J Biol Chem* 283(37):25,428-25,436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804146200>
148. Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Kim KH, de Val S, Kang C, Sul HS (2009) ADPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 15(2):150-168. <https://doi.org/10.1038/nm.1904>
149. Uyama T, Morishita J, Jim XH, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueda N (2009) The tumor suppressor gene H-Rex107 functions as a novel Ca2+-independent cytosolic phospholipase A1/2 of the thiol hydrolase type. *J Lipid Res* 50(4):685-693. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800453-JLR200>
150. Sers C, Emmenegger U, Hutmans K, Bucher K, Andres AG, Schafer R (1997) Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene H-rx107 in tumor cell lines and experimental tumors. *J Cell Biol* 136(4):935-944
151. Sanchez-Alavez M, Klein I, Brownell SE, Tabarean IV, Davis CN, Conit B, Barfai T (2007) Night eating and obesity in the EP3R-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8):3009-3014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611209104>
152. Matsumoto Y, Mineta S, Murayama K, Sugimoto D (2013) A novel phospholipase B from *Streptomyces* sp. NΔ684-purification, characterization, gene cloning, extracellular production and prediction of the catalytic residues. *FEBS J* 280:3780-3796 (1742-4658 (Electronic))
153. Morgan CP, Inzell R, Hayes L, Cockcroft S (2004) Identification of phospholipase B from *Dicrostonyx* discoidium reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast. *Biochem J* 382(Pt 2):441-449. <https://doi.org/10.1042/Bj20040110>
154. Lu T, Ito M, Teshoua U, Takemori H, Okamoto M, Togo H (2001) Identification of essential residues for catalysis of rat intestinal phospholipase B/lipase. *Biochemistry* 40(24):7133-7139
155. Chen SC, Wright LC, Santangelo RT, Muller M, Moran VR, Kutschei PW, Sorrell TC (1997) Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 65(2):405-411
156. Fan JL, Strugnell RA, Hoyne PA, Michalski WP, Tennent JM (2001) Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *J Bacteriol* 183(22):6717-6720. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6717-6720.2001>
157. Maury E, Prevost MC, Nanze M, Redoutes D, Tarroux R, Charveron M, Salles JP, Perret B, Chap H, Gassama-Diagne A (2002) Human epididymis is a novel site of phospholipase B expression. *Biochem Biophys Res Commun* 295(2):362-369
158. Delagebandeuf C, Gassama A, Collet X, Nanze M, Chap H (1996) Guinea pig intestinal phospholipase B: protein expression during erythrocyte maturation and effects of N-oligosaccharide removal on enzymatic activities and protein stability. *Biochim Biophys Acta* 1303(2):119-126
159. Delagebandeuf C, Gassama-Diagne A, Nanze M, Kagab A, Li KK, Capdevielle J, Ferrera P, Faivel J, Chap H (1998) Biochemical characterization and cloning of guinea pig intestinal phospholipase B. *Ann N Y Acad Sci* 859:192-193
160. Djordjevic IT (2010) Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from cryptococcal neoformans. *Front Microbiol* 1:125
161. Goni FM, Montes LR, Alonso A (2012) Phospholipases C and sphingomyelinases: Lipids as substrates and modulators of enzyme activity. *Prog Lipid Res* 51:238-266
162. Le Moigne V, Rothman M, Gouillard C, Barreau B, Porcin I, Soismier N, Cnaan S, Pitarid B, Gaillard JL, Herrmann JL (2015) Bacterial phospholipases C as vaccine candidate antigens against cystic fibrosis respiratory pathogens: the Mycobacterium abscessus model. *Vaccine* 33(18):2118-2124. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.030>
163. Exton JH (1994) Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1212(1):26-42. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90186-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90186-4)
164. Podo F, Paris I, Cecchetti S, Spadaro F, Abalomo L, Ramoni C, Ricci A, Pisana ME, Sardanelli F, Carrese R, Iorio E (2016) Activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in breast and ovarian cancer: impact on MRS-detected choline metabolic profile and perspectives for targeted therapy. *Front Oncol* 6:171. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00171>
165. Pokorny I, Kolenikov Y, Kravets V, Zachwoski A, Rutland E (2014) Plant phosphonositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme. *Biochimie* 96:144-157. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.004>
166. Pokorny I, Reichar P, Porocky M, Kocourkova D, Kreckova Z, Rutland E, Kravets V, Martinek J (2013) The plant non-specific phospholipase C gene family: Novel competitors in lipid signaling. *Prog Lipid Res* 52(1):62-79. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.09.001>
167. Hough E, Hansen IK, Birkenes B, Jynge K, Hansen S, Hordvik A, Little C, Dodson E, Derewenda Z (1989) High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature* 338(6213):357-360. <https://doi.org/10.1038/338357a0>
168. Kohrsitzate S, Tomaras AP, Damm S, Kunnend J, Simon Y, Lengwehasattit J, Vasil ML, Supnarak S (2007) Characterization of two distinct phospholipase C enzymes from *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 153(Pt 6):1907-1915. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003004-0>
169. Rossignol G, Meriau A, Guertlin J, Veron W, Lesouhaitier O, Feuilloloy MG, Orange N (2008) Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiol* 8:189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-189>
170. Argon Y, Rosser O, Ciancotto NP (2002) *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiol* 148(Pt 7):2223-2231. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2223>
171. Triball RW (1993) Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* 57(2):347-366
172. Cheng Y, Zhao Q, Liu X, Anki S, Zhang S, Miao J (2006) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, p53 and ROS in the association of apoptosis and senescence in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 580(20):4911-4915. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.008>

173. Cifone MG, Roncajoli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G, Testi R (1995) Multiple pathways originate at the Fas/ATP-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J* 14(23):5859-5868
174. Ramoni C, Spadaro F, Bartetta B, Dupuis ML, Podo F (2004) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C in nitrogen-stimulated fibroblasts. *Exp Cell Res* 299 (2):370-382. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.05.037>
175. Wang N, Xie K, Hao S, Zhao J, Zhang S, Miao J (2007) Suppressing phosphatidylcholine-specific phospholipase C and elevating ROS level, NADPH oxidase activity and Rb level induced neuronal differentiation in mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 100(6):1548-1557. <https://doi.org/10.1002/jcb.21139>
176. Cecchetti S, Spadaro F, Gessani S, Podo F, Farnuzzi L (2017) Phospholipases: at the crossroads of the immune system and the pathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 101(1):53-75. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0316-148RR>
177. Abalsamo L, Spadaro F, Bozzuto G, Paris L, Cecchetti S, Lugnani L, Iorio E, Molinari A, Ramoni C, Podo F (2012) Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C results in loss of mesenchymal traits in metastatic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 14(2):R50. <https://doi.org/10.1186/bcr3151>
178. Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, Pisani ME, Castellano G, Di Vito M, Venturini E, Glunde K, Bhujwala ZM, Mezzanatica D, Canerari S, Podo F (2010) Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 70 (5):2126-2135. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CCR-09-3833>
179. Paris L, Cecchetti S, Spadaro F, Abalsamo L, Lugnani L, Pisani ME, Iorio E, Natali PG, Ramoni C, Podo F (2010) Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C downregulates HER2 overexpression on plasma membrane of breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 12(3):R27. <https://doi.org/10.1186/bcr2575>
180. Spadaro F, Ramoni C, Mezzanatica D, Miorzi S, Alberti P, Cecchetti S, Iorio E, Dolo V, Canerari S, Podo F (2008) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 68(16):6541-6549. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CCR-07-6763>
181. Wolf RA, Gross RW (1985) Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasminogen selective phospholipase A2 in canine myocardium. *J Biol Chem* 260 (12):7295-7303
182. Sheikhnajad RG, Srivastava PN (1986) Isolation and properties of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C from bull seminal plasma. *J Biol Chem* 261(16):7544-7549
183. Mateos MY, Salvador GA, Guistro NM (2010) Selective localization of phosphatidylcholine-derived signaling in detergent-resistant membranes from synaptic endings. *Biochim Biophys Acta* 1798(3):624-636. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.008>
184. Adibhatla RM, Hatcher JF, Guaini A (2012) Tricyclic decan-9-yl-xanthogenate (D609) mechanism of actions: a mini-review of literature. *Neurochem Res* 37(4):671-679. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0659-z>
185. Wimalasekera R, Peichar P, Folk A, Martinec J, Scherer GF (2010) Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 3 (3):610-625. <https://doi.org/10.1093/mp/psq005>
186. Kocourkova D, Kerkova Z, Peichar P, Veselkova S, Valentova O, Wimalasekera R, Scherer GF, Martinec J (2011) The phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C NPC4 plays a role in response of *Arabidopsis thaliana* to salt stress. *J Exp Bot* 62 (11):3753-3763. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert039>
187. Peichar P, Potocky M, Novotna Z, Veselkova S, Kocourkova D, Valentova O, Schwarzerova K, Martinec J (2010) Alumininium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C in tobacco cells. *New Phytol* 188(1):150-160. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03349.x>
188. Peters C, Li M, Narasimhan R, Roth M, Welt R, Wang X (2010) Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22 (8):2642-2659. <https://doi.org/10.1105/pc.109.071720>
189. Felts RL, Reilly TJ, Tanner JJ (2006) Structure of *Francisella tularensis* AcpA: prototype of a unique superfamily of acid phosphatases and phospholipases C. *J Biol Chem* 281 (40):30289-30298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606391200>
190. Gande N, Nakamura Y, Scheible WR, Ohta H, Dormann P (2008) Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 56(1):28-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03582.x>
191. Nakahara M, Shimozawa M, Nakamura Y, Irimo Y, Morita M, Kudo Y, Fukami K (2005) A novel phospholipase C, PLC(eta)2, is a neuron-specific isozyme. *J Biol Chem* 280 (32):29128-29134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503817200>
192. Reddy VS, Rao DK, Rajasekharan R (2010) Functional characterization of lysophosphatidic acid phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1801 (4):455-461. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.005>
193. Kadamur G, Ross EM (2013) Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol* 75:127-154. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183750>
194. Wei Z, Zentgraf LA, Goldfine H (2005) *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C has evolved for virulence by greatly reduced activity on GPI anchors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (36):12927-12931. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501725102>
195. Folio MV, Manzoli L, Poli A, McCubrey JA, Cocco I (2015) PLC and PI3K/Akt/mTOR signaling in disease and cancer. *Adv Biol Regul* 57:10-16. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.004>
196. Williams RL (1999) Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim Biophys Acta* 1441 (2-3):255-267
197. Nakamura Y, Fukami K (2017) Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *J Biochem* 161 (4):315-321. <https://doi.org/10.1093/jb/mw094>
198. Bunney TD, Katan M (2011) PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem Sci* 36 (2):88-96. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.08.003>
199. Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco I, Peak IC, Katan M, Fukami K, Kataroka T, Yun S, Ryu SH (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* 41(6):415-434
200. Essen L-O, Perisic O, Cheung K, Katan M, Williams RL (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C8. *Nature* 380:595-602
201. Essen L-O, Perisic O, Lynch DE, Katan M, Williams RL (1997) A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C8. *Biochemistry* 36:2753-2762
202. Rebecchi MJ, Penyala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80 (4):1291-1335
203. Nalefski EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 5(12):2375-2390
204. Pounting CP, Kerr ID (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 Sci* 5(5):914-922. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050513>
205. Pounting CP, Parker PJ (1996) Extending the C2 domain family: C2s in PKCs delta, epsilon, eta, theta, phospholipases, GATs, and perforin. *Protein Sci* 5(1):162-166
206. Oerchenberg I, Sommer M, Pical C (2001) N-terminal EF-hand-like domain is required for phosphoinositide-specific phospholipase C activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 497(2-3):165-170
207. Haslam RJ, Koide HB, Hemmings BA (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature* 363 (6427):309-310. <https://doi.org/10.1038/363309b0>
208. Mayer BJ, Ren R, Clark KL, Baltimore D (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73 (4):629-630
209. Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler FB (1995) Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83(6):1037-1046
210. Singer WD, Brown HA, Sternweis PC (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem* 66:475-509
211. Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:281-312. <https://doi.org/10.1105/pc.109.071720>

- doi.org/10.1146/annurev-biochem.70.1.281
212. Sozzani P, Hasan L, Seguelas MH, Caput D, Ferrara P, Pipy B, Cambon C (1998) IL-13 induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma-1 following IRS-2 association in human monocytes: relationship with the inhibitory effect of IL-13 on ROI production. *Biochem Biophys Res Commun* 244(3):665-670. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8314>
213. Venema RC, Ju H, Venema VJ, Schieffer B, Hap JB, Ling BN, Eaton DC, Marrero MB (1998) Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G-protein-coupled AT1 receptor. *J Biol Chem* 273(13):7703-7708
214. Venema VJ, Ju H, Sun J, Eaton DC, Marrero MB, Venema RC (1998) Bradykinin stimulates the tyrosine phosphorylation and bradykinin B2 receptor association of phospholipase C gamma 1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246(1):70-75. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8574>
215. Smrcka AV, Brown JH, Holz GG (2012) Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal* 24(6):1333-1343. <https://doi.org/10.1016/j.celsig.2012.01.009>
216. Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude R, Swann K (2004) Phospholipase C ζ causes Ca $^{2+}$ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 128(6):697-702. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00484>
217. Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA (2004) The cytosolic sperm factor that triggers Ca $^{2+}$ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC ζ . *Reproduction* 127(4):431-439. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00169>
218. Zhou Y, Wing MR, Sondak J, Harden TK (2005) Molecular cloning and characterization of PLC ζ 2. *Biochem J* 391(Pt 3):667-676. <https://doi.org/10.1042/BJ20050839>
219. Yang SF, Freer S, Benson AA (1967) Transphosphatidation by phospholipase D. *J Biol Chem* 242(3):477-484
220. Hanahan DJ, Chalkoff IL (1947) The phosphorus-containing lipides of the carrot. *J Biol Chem* 168(1):233-240
221. Dawson RM (1967) The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D. *Biochem J* 102(1):205-210
222. Wang X, Dyer JH, Zheng L (1993) Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys* 306(2):486-494
223. Aboonssalam A, Riviere M, Teissere M, Veger R (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim Biophys Acta* 1158(1):1-7
224. Aboonssalam A, Teissere M, Gardies AM, Veger R, Noat G (1995) Phospholipase D from soybean (*Glycine max* L.) suspension-cultured cells: purification, structural and enzymatic properties. *Plant Cell Physiol* 36(6):989-996
225. Wang X, Xu L, Zheng L (1994) Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from Ricinus communis L. *J Biol Chem* 269(32):20312-20317
226. Selye PE, Lavien RR, Lindsley CW, Brown HA (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111(10):6064-6119. <https://doi.org/10.1021/cr2002926>
227. Hammond SM, Alshuler YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engerercht J, Morris AJ, Frohman MA (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem* 270(50):29640-29643
228. Shulga YV, Loukov D, Ivanova PT, Milne SB, Myers DS, Hatch GM, Uneh G, Jalani D, Fullerton MD, Steinberg GR, Toppan MK, Brown HA, Epan RM (2013) Diacylglycerol kinase delta promotes lipogenesis. *Biochemistry* 52(44):7766-7776. <https://doi.org/10.1021/bi401178y>
229. Andreyev AY, Fahy E, Guan Z, Kelly S, Li X, McDonald JG, Milne S, Myers D, Park H, Ryan A, Thompson BM, Wang E, Zhao Y, Brown HA, Merrill AH, Reitz CR, Russell DW, Subramanian S, Dennis EA (2010) Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J Lipid Res* 51(9):2785-2797. <https://doi.org/10.1194/jlr.M0008748>
230. Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, de Kruijf B, Burger KN, Rand PR (2005) Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44(6):2097-2102. <https://doi.org/10.1021/bi0478502>
231. Bruntz RC, Lindsley CW, Brown HA (2014) Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in

- cancer. *Pharmacol Rev* 66(4):1033-1079. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009217>
232. Kooijman EE, Burger KN (2009) Biophysics and function of phosphatidic acid: a molecular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1791(9):881-888. <https://doi.org/10.1016/j.bbblp.2009.04.001>
233. Segner D, Theihnann I, Kraft P, Frohman MA, Stoll G, Nieswandt B (2013) Pharmacological inhibition of phospholipase D protects mice from occlusive thrombus formation and ischemic stroke—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(9):2212-2217. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302030>
234. Kang DW, Park MK, Oh HJ, Lee DG, Park SH, Choi KY, Cho MI, Min do S (2013) Phospholipase D1 has a pivotal role in interleukin-1beta-driven chronic autoimmune arthritis through regulation of NF-kappaB, hypoxia-inducible factor 1alpha, and FoxO3a. *Mol Cell Biol* 33(14):2760-2772. <https://doi.org/10.1128/MCB.01519-12>
235. Oliveira TG, Di Paolo G (2010) Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801(8):799-805. <https://doi.org/10.1016/j.bblp.2010.04.004>
236. Bluth M, Lin Y, Zhang H, Virecho D, Zenilman M (2008) Use of gene expression profiles in cells of peripheral blood to identify new molecular markers of acute pancreatitis. *Arch Surg* 143(3):227-233; discussion 233-224. <https://doi.org/10.1001/archsurg.2007.73>
237. Sethu S, Pusiparaji PN, Melendez AJ (2010) Phospholipase D1 mediates TNFalpha-induced inflammation in a murine model of TNFalpha-induced peritonitis. *PLoS One* 5(5):e10506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010506>
238. Lee M-Y, Kim SY, Min DS, Choi Y-S, Shin S-L, Chinn M-H, Lee SB, Kim M-S, Jo Y-H (2000) Upregulation of phospholipase D in astrocytes in response to transient forebrain ischemia. *Glia* 30(3):311-317. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(200005\)30:3<311::aid-glia10>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(200005)30:3<311::aid-glia10>3.0.co;2-k)
239. Henkels KM, Boivin GP, Dudley ES, Berberich SJ, Gomez-Cambreno J (2013) Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograft model. *Oncogene* 32(49):5551-5562. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.207>
240. Zhao Y, Ehara H, Akao Y, Shanoto M, Nakagawa Y, Banno Y, Deguchi T, Ohishi N, Yagi K, Nozawa Y (2000) Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 278(1):140-143. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3719>
241. Park MH, Ahn BH, Hong YK, Min do S (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. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn287>
242. Saito M, Iwadeite M, Higashimoto M, Ono K, Takebayashi Y, Takenoshita S (2007) Expression of phospholipase D2 in human colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 18(5):1329-1334
243. Kang YH, Kim D, Jin EJ (2015) Down-regulation of phospholipase D stimulates death of lung cancer cells involving up-regulation of the long ncRNA ANRIL. *Anticancer Res* 35(5):2795-2803
244. Nelson RK, Frohman MA (2015) Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *J Lipid Res* 56(12):2229-2237. <https://doi.org/10.1194/jlr.R059720>
245. Chen Q, Hongu T, Sato T, Zhang Y, Ali W, Cavallo JA, van der Velden A, Tian H, Di Paolo G, Nieswandt B, Kanaho Y, Frohman MA (2012) Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. *Sci Signal* 5(249):ra79. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003257>
246. Gobel K, Schuhmann MK, Pankatz S, Steger D, Herrmann AM, Braun A, Breiter J, Birmer S, Ruck T, Wendt H, Kleinschmitz C, Nieswandt B, Meuth SG (2014) Phospholipase D1 mediates lymphocyte adhesion and migration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 44(8):2295-2305. <https://doi.org/10.1002/eji.201344107>
247. Sung TC, Zhang Y, Morris AJ, Frohman MA (1999) Structural analysis of human phospholipase D1. *J Biol Chem* 274(6):3659-3666
248. Choi SY, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8(11):1255-1262. <https://doi.org/10.1038/ncb1487>
249. Philipp F, Ha EE, Seeliger MA, Frohman MA (2017) Measuring phospholipase D enzymatic activity through biochemical and imaging methods. *Methods Enzymol* 583:309-325. <https://doi.org/10.1016/bs.mec.2016.09.041>

250. Wang X (2000) Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog Lipid Res* 39(2):109–149
251. Pinosa E, Bahor N, Kwaaitaal M, Fahlberg P, Thordal-Christensen H, Ellerstrom M, Andersson MX (2013) Arabidopsis phospholipase delta is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi. *Plant Physiol* 163(2):896–906. <https://doi.org/10.1104/pp.113.223503>
252. Abdelkati S, Aboussalham A (2011) The substrate specificities of sunflower and soybean phospholipases D using transphosphatidyltransferase reaction. *Lipids Health Dis* 10:196. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-196>
253. Rahier R, Noiriel A, Aboussalham A (2016) Development of a direct and continuous phospholipase D assay based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline. *Anal Chem* 88(1):666–674. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02332>
254. Zhao J, Wang C, Bedair M, Welti R, Sumner LW, Baxter I, Wang X (2011) Suppression of phospholipase Dgamma5 confers increased aluminum resistance in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 6(12):e28086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028086>
255. Wang C, Wang X (2001) A novel phospholipase D of Arabidopsis that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane. *Plant Physiol* 127(3):1102–1112
256. Hong Y, Devaiah SP, Bahn SC, Thammesandra BN, Li M, Welti R, Wang X (2009) Phospholipase D epsilon and phosphatidic acid enhance Arabidopsis nitrogen signaling and growth. *Plant J* 58(3):376–387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.03788.x>
257. Rudge SA, Zhou C, Engelsecht J (2002) Differential regulation of Saccharomyces cerevisiae phospholipase D in sporulation and Sec14-independent secretion. *Genetics* 160(4):1353–1361
258. Leitros I, Secundo E, Zambonelli C, Servi S, Hough E (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* 8(6):655–667
259. Leitros I, McSwaney S, Hough E (2004) The reaction mechanism of phospholipase D from *Streptomyces* sp. strain PMF: Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product. *J Mol Biol* 339(4):805–820. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.003>
260. Struckey JA, Dixon JE (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol* 6(3):278–284. <https://doi.org/10.1038/6716>
261. DeYonker NJ, Webster CE (2013) Phosphoryl transfers of the phospholipase D superfamily: a quantum mechanical/theoretical study. *J Am Chem Soc* 135(37):13,764–13,774. <https://doi.org/10.1021/ja4042753>
262. Xie Z, Ho WT, Exton JH (1998) Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. *J Biol Chem* 273(52):34,679–34,682
263. Xie Z, Ho WT, Exton JH (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. *J Biol Chem* 275(32):24,962–24,969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909745199>
264. Sung TC, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Tenfelz R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engelsecht J, Frohman MA (1997) Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J* 16(15):4519–4530. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.15.4519>
265. Chang IF, Curran A, Woolsey R, Quilici D, Cushman JC, Mitterer R, Harmon A, Harper JF (2009) Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in Arabidopsis thaliana. *Proteomics* 9(11):2967–2985. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800445>
266. Shin R, Jez JM, Basra A, Zhang B, Schachtman DP (2011) 14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *EBS Lett* 585(1):143–147. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.025>
267. Zambonelli C, Roberts MF (2005) Non-HKD phospholipase D enzymes: new players in phosphatidic acid signaling? *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 79:133–181. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(04\)79003-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(04)79003-0)
268. Zambonelli C, Casali M, Roberts MF (2003) Mutagenesis of putative catalytic and regulatory residues of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D differentially modifies phosphatase and phosphodiesterase activities. *J Biol Chem* 278(52):52,282–52,289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310252200>
269. Correa MA, Okamoto CK, Goncalves-de-Andrade RM, van den Berg CW, Tambourgi DV (2016) Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom induces the expression of MMP7 in human keratinocytes: contribution to dermonecrosis. *PLoS One* 11(4):e0153090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153090>
270. Rojas JM, Aran-Sekul T, Cortes E, Jaldin R, Ordenes K, Orengo PR, Gonzalez J, Araya JE, Catalan A (2017) Phospholipase D from *Loxosceles laeta* spider venom induces IL-6, IL-8, CXCL1/GRO-alpha, and CCL2/MCP-1 production in human skin fibroblasts and stimulates monocytes migration. *Toxins* 9(4). <https://doi.org/10.3390/toxins9040125>
271. Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279(7):5298–5305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306642200>
272. Magotti P, Bauer I, Igarashi M, Babagoli M, Marotta R, Pionelli D, Garau G (2015) Structure of human N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D: regulation of fatty acid ethanolamide biosynthesis by bile acids. *Structure* 23(3):598–604. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.12.018>
273. Houben AJ, Moolenaar WH (2011) Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30(3-4):557–565. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9319-7>
274. Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, Fulkerson Z, Albers HM, van Mleeuwen LA, Houben AJ, van Zeijl L, Janson S, Andries M, Hall T, Pegg JE, Bertson TT, Kastern M, Harlos K, Kooi CW, Smyth SS, O'vaa H, Bollen M, Morris AJ, Moolenaar WH, Perrakis A (2011) Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* 18(2):198–204. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1980>
275. Jones SB, Pfeifer LA, Briesch TJ, Beauchamp TJ, Durbin JD, Klimkowski VJ, Hughes NE, Rito CJ, Dao Y, Gruber JM, Bui H, Chambers MG, Chandrasekhar S, Lin C, McCann DJ, Mudra DR, Oskins JL, Swearingen CA, Thirunavukkarasu K, Norman BH (2016) Novel autotaxin inhibitors for the treatment of osteoarthritis pain: lead optimization via structure-based drug design. *ACS Med Chem Lett* 7:857–861. <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.6b00207>

Article 4

Rahier, R., Abla, H., Arhab, Y., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2018).

Direct and Continuous Measurement of Phospholipase D Activities Using the Chelation-Enhanced Fluorescence Property of 8-Hydroxyquinoline.

[Methods Mol Biol.](#) 2018;1835:129-138. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_6.



Direct and Continuous Measurement of Phospholipase D Activities Using the Chelation-Enhanced Fluorescence Property of 8-Hydroxyquinoline

Renaud Rahier, Houda Abia, Yani Arhab, Alexandre Noiriel, and Abdelkarim Abousalham

Abstract

Phospholipase D (PLD) hydrolyzes phospholipids to form phosphatidic acid (PA) and the corresponding headgroup. To date, PLD has been linked to several pathologies, such as cancer, 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 upon phosphatidylcholine (PC) hydrolysis. Therefore, we designed a PLD assay that is based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline. This assay exhibits a strong fluorescence signal upon Ca^{2+} complexation with the PLD-generated PA and is not limited to PC as the substrate but allows the use of natural phospholipids with various headgroups. Besides, this easy-to-handle assay allows to monitor prokaryotic and eukaryotic PLD activities in a continuous way and on a microplate scale.

Key words Phospholipase D, 8-Hydroxyquinoline, Assay, Fluorescence, Phosphatidic acid, Microplate, Transphosphatidylation, Inhibitors, Screening

1 Introduction

Through its central role in membrane signaling and vesicular trafficking, phospholipase D (PLD) has been linked to numerous pathologies, such as cancers [1]. At a molecular level, PLD hydrolyzes the distal phosphodiester bond of glycerophospholipids, to produce phosphatidic acid (PA) and to release the corresponding headgroup. PLD also catalyzes the transphosphatidylation reaction which, in the presence of a primary alcohol, produces the corresponding phosphatidylalcohol [2]. Although many methods for measuring PLD activities have been described to date, they all present several limitations in terms of implementation, sensitivity, or specificity of detection. So far, radiolabeled phospholipids have been the most extensively used substrates for PLD [3]. However,

despite their high sensitivity, radioactivity-based assays tend to be laborious, discontinuous, and not suitable for high-throughput studies. These issues have been solved either by the use of coupled enzymes, such as choline oxidase and peroxidase [4, 5], which allow the quantification of free choline upon phosphatidylcholine (PC) hydrolysis, or by the use of synthetic substrates, such as phosphatidyl-*p*-nitrophenol [6]. However, both assays are restricted to specific substrates and prevent, thus, the substrate preference determination of PLD toward naturally occurring phospholipids, such as phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), or phosphatidylglycerol (PG). Thus, the simplest solution to overcome this problem lies in the determination of PA, since it is invariably produced during the hydrolysis reaction of all phospholipids. Several groups have been able to develop PA quantification methods that rely on its ability to fix Fe^{3+} [7], competing with salicylic acid, or on the inorganic phosphate quantification [8], generated by alkaline phosphatase. However, these methods present the drawback of being indirect and discontinuous, similarly to radioactivity-based assays. To address all of these issues, we have recently developed a novel fluorescent PLD assay [9], which is based on the direct and continuous determination of PA by 8-hydroxyquinoline (8HQ) in the presence of Ca^{2+} . Indeed, 8HQ is a hydrophobic bidentate chelating agent that becomes fluorescent upon Ca^{2+} chelation in the presence of a phosphate group [10], such as the one found in PA. Besides, the presence of Ca^{2+} appears crucial in this assay, since it is required for both the Ca^{2+} -dependent production of PA by PLD and the formation of the fluorescent 8HQ/ Ca^{2+} /PA complex, which can be quantified in real time. Therefore, this assay has allowed us to determine the substrate preference of PLD, using natural phospholipids with various headgroups, on a microplate scale. Also, we have been able to monitor prokaryotic and eukaryotic PLD activities, even in crude protein extract samples, and to adapt this method for the screening of potential PLD inhibitors. Finally, we have successfully used this assay to indirectly monitor the transphosphatidylation reaction, which competes with the formation of PA during the hydrolysis reaction.

2 Materials

2.1 Equipment

1. 2 mL glass tubes.
2. Glass syringes.

3. Vortex.
4. Bath-type sonicator.
5. Black 96-well microplate.
6. Fluorescence microplate reader.

2.2 Glycerophospholipids

1. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) at 20 mM in chloroform. Store at -20°C .
2. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (POPA) at 20 mM in chloroform. Store at -20°C .
3. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*sn*-glycerol) (POPG) at 20 mM in chloroform. Store at -20°C .
4. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) at 20 mM in chloroform. Store at -20°C .
5. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) at 20 mM in chloroform. Store at -20°C .

2.3 Proteins

1. Recombinant *Vigna unguiculata* PLD (VuPLD). VuPLD is produced in the yeast *Pichia pastoris* X-33 and purified as previously described [11].
2. Cabbage (*Brassica oleracea*) PLD (BoPLD).
3. Peanut (*Arachis hypogaea*) PLD (AhPLD).
4. *Streptomyces chromofuscus* PLD (ScPLD).
5. All enzyme concentrations are determined using the Bradford's procedure [12], with dye reagent and bovine serum albumin as the standard.

2.4 Stock Solutions

1. 2 mM 8HQ solution: solubilize 58 mg of 8HQ powder in a final volume of 200 mL of hot water under magnetic stirring. Store at room temperature in an opaque bottle (see Notes 1 and 2).
2. 100 mM SDS solution: solubilize 5.7 g of SDS powder in a final volume of 200 mL of water under magnetic stirring. Store at room temperature.
3. 100 mM Triton X-100 solution: dissolve 6.5 g of Triton X-100 in a final volume of 100 mL of water under magnetic stirring. Filter through a 0.22 μm membrane and store at $+4^{\circ}\text{C}$ (see Note 3).
4. 1 M Tris-HCl, pH 8.0: solubilize 121.1 g of Tris in 800 mL of water under magnetic stirring and adjust the pH to 8.0 with HCl (10%). Complete to 1 L with water and store at $+4^{\circ}\text{C}$.
5. 100 mM EDTA solution: solubilize 5.8 g of EDTA in a final volume of 100 mL of water under magnetic stirring and store at room temperature.

2.5 Detergents/8HQ Mixture

1. 5x stock solution: 270 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5.4 mM Triton X-100, 3.75 mM SDS, 350 μM 8HQ, and 270 μM EDTA.
2. Buffer A: perform a 1.5-fold dilution from the 5x stock solution.
3. Buffer B: perform a fivefold dilution from the 5x stock solution.

3 Methods

Typical assays are carried out in a final volume of 150 μL using POPC, POPE, POPG, or POPS as the substrate (Fig. 1a). All fluorescence experiments are recorded at 30°C using a microplate fluorescence reader. Fluorescence emission intensities at 490 nm are recorded as a function of time (λ_{exc} 366 nm). This method can be applied to monitor the activity of prokaryotic or eukaryotic PLD as presented in Fig. 1b. PA formation rates are deduced from a calibration curve (Fig. 2) conducted in the same experimental conditions as the assay.

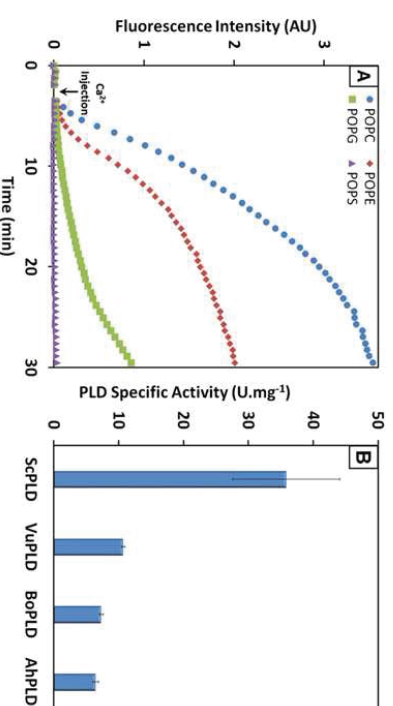


Fig. 1 (A) Kinetic curve of POPA formation by VuPLD (0.1 μg) using SDS/Triton X-100 mixtures containing 0.26 mM of POPC, POPE, POPG, or POPS as the substrate and following an injection (arrow) of 20 mM of CaCl_2 (AU, arbitrary units). (B) Specific activities of ScPLD, VuPLD, BoPLD, and AhPLD toward POPC, in the same experimental conditions of (A). The rates of POPA formation are determined from the steady-state part of the kinetic curve (see Subheading 3.4). Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments

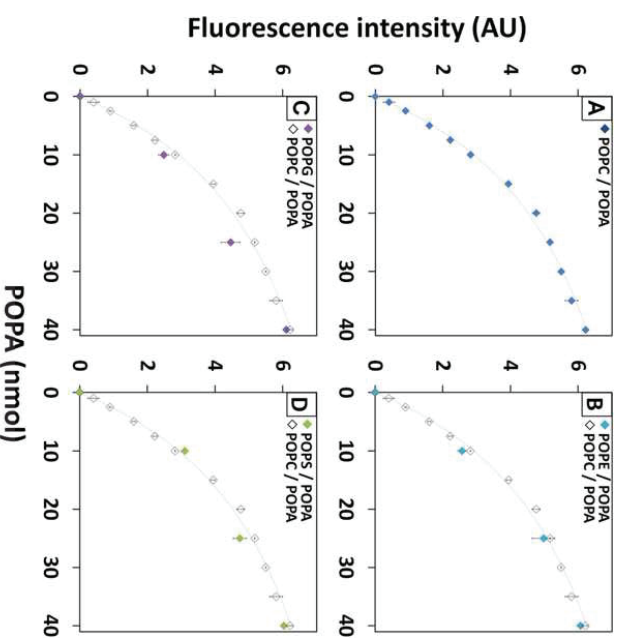


Fig. 2 Calibration curve for the quantification of POPA using 8HQ fluorescence at 490 nm (λ_{ex} 366 nm) and fitted (dashed curve) using a nonlinear regression (see Subheading 3.4). 8HQ is incubated with SDS/Triton X-100 mixtures containing increasing amounts of POPA at pH 8, in the presence of 20 mM Ca^{2+} . Each value is obtained by increasing the proportions of POPA in line with decreasing the proportions of POPC (A), POPE (B), POPG (C), or POPS (D) 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

3.1 Substrate Preparation

1. Using a glass syringe, add 2 μ L (per assay) of the glycerophospholipid to be tested (i.e., POPC, POPE, POPG, or POPS – 20 mM in chloroform) into a clean glass tube (see Notes 4 and 5).
2. Evaporate chloroform under a stream of nitrogen.
3. Add 42 μ L (per assay) of buffer A to the dried glycerophospholipid.
4. Gently redissolve the dried glycerophospholipid with a pipette and vortex well.
5. Sonicate the micellar solution for 10 min using a bath-type sonicator.

3.2 Assay Procedure

1. Before beginning, set the temperature of the microplate reader at 30 °C.
2. Into a black 96-well microplate, dispense 42 μ L per well of the substrate solution.
3. Into the corresponding wells, distribute a volume (up to 98 μ L) of the PLD sample along with the corresponding blank solution, such as buffer or heat-inactivated PLD, in triplicate (see Note 6).
4. Depending on the added volume of PLD, complete to 140 μ L with a volume of Milli-Q grade water (see Note 7). This volume of water can be replaced/completed by a volume of alcohol, to perform the transphosphatidylation reaction, or a volume of PLD inhibitor (see Notes 8 and 9).
5. Place the microplate into the reader and let it incubate at 30 °C for 10 min.

6. Set the excitation wavelength at 366 nm and the emission wavelength at 490 nm, using bandwidths of 9 nm for excitation and 20 nm for emission (see Notes 10 and 11).

7. For a kinetic measurement of 30 min, set parameters at 60 reads, with regular 30 s interval and orbital shaking for 5 s, before each read.

8. Record the background fluorescence (I_{f0}) for 120 s.

9. Start the reaction by adding 10 μ L of the $CaCl_2$ solution (final volume of 150 μ L), and record the fluorescence intensity (I_f) as a function of time (Fig. 1) (see Notes 12 and 13).

3.3 Preparation of Calibration Standards

1. In chloroform, prepare a tenfold dilution (2 mM) of POPA and the glycerophospholipid substrate from stock solutions.
2. Using a glass syringe, prepare in different glass tubes a triplicate of five to ten dilutions of increasing amounts of POPA (0–50 nmol) along with decreasing amounts of the glycerophospholipid substrate (50–0 nmol), in order to maintain the final amount of glycerophospholipids constant at 50 nmol (see Note 14).
3. Evaporate all chloroform solutions under a stream of nitrogen.
4. Add 175 μ L of buffer B to each mix of dried glycerophospholipids.
5. Resuspend, vortex, and sonicate all dilutions for 10 min, as previously described (see Subheading 3.1, steps 4 and 5).
6. Dispense 140 μ L of each dilution into separate wells of a black 96-well microplate.
7. Add 10 μ L of the $CaCl_2$ solution in each well (see Note 7) to obtain a final volume of 150 μ L and to achieve a final

- concentration ranging from 0 to 266 μM).
8. Place the microplate into the reader, shake for 1 min, and let it incubate at 30 °C for 10 min.
9. Set the excitation wavelength at 366 nm and the emission wavelength at 490 nm, using bandwidths of 9 nm for excitation and 20 nm for emission (*see Note 10*).
10. Shake for 5 s, let it incubate for 1 min, and record the fluorescence intensity (Fig. 2).

3.4 Data Processing

3.4.1 Calibration Curve

The obtained data are processed by fitting to the following equation:

$$If = \frac{a[PA]}{b + [PA]} + If0 \quad (1)$$

where If and If0 are the fluorescence intensities obtained, respectively, in the presence or absence of POPA, a and b are constants, and [PA] represents the added POPA concentration.

3.4.2 PLD Activities Determination

1. For each kinetic recording, POPA quantities are determined using the following equation:

$$[PA] = \frac{b(If - If0)}{a - (If - If0)} \quad (2)$$

2. The amounts of POPA are determined from the linear part of the kinetic curve ($R^2 > 0.97$), which corresponds to the steady state of the reaction rate.
3. One unit of PLD activity is defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of POPA per min under these experimental conditions.

4 Notes

1. Since 8HQ is slightly soluble in water, use hot water to ensure its optimal dissolution and let it gently cool before use.
2. As many fluorescent compounds, 8HQ is light sensitive and should be stored in an opaque bottle.
3. When diluted, Triton X-100 solution needs to be sterilized through a 0.22 μm membrane filter and stored at 4 °C (or -20 °C for long periods), to avoid bacterial contamination.
4. We strongly recommend to use phospholipids harboring at least one unsaturated fatty acid. In our laboratory, best results

- were obtained using 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospholipids.
5. Always plan to prepare an additional volume of assay, since some liquid may be lost on tube walls.
6. We strongly recommend to perform several dilutions of the sample to be tested in order to ensure that the activity falls within the linear range of the method. This is particularly important when assaying crude protein extracts, since the PLD concentration is not known and can lead to over- or underestimation of activity values.

7. When distributing the solution into the wells, SDS and Triton X-100 tend to form bubbles. You can burst the bubbles with a quick hot airstream using a hair dryer (bubbles will burst instantly).

8. Conversely to PLD assays using phosphatidyl-*p*-nitrophenol or choline oxidase-/peroxidase-coupled assays, which monitor the headgroup release, 8HQ allows to monitor the production of PA during the hydrolysis reaction. We can take advantage of this property to follow the transphosphatidylation reaction, which competes with the hydrolysis reaction. Indeed, PLD catalyzes the transfer of the phosphatidyl moiety of glycerophospholipids to a nucleophilic acceptor that can be either water or a primary alcohol, to produce PA and a phosphatidylalcohol, respectively. Therefore, during the transphosphatidylation reaction, the headgroup release remains unchanged in comparison with the hydrolysis reaction. In contrast, PA formation decreases as a function of alcohol concentration, which is reflected by a decrease of the 8HQ fluorescence. In order to follow the transphosphatidylation reaction, the added volume of water (*see Subheading 3.2, Notes 8 and 9*) can be replaced by a volume of pure or diluted alcohol, such as ethanol (Fig. 3).

9. This method can also be used to screen potential PLD inhibitors. To monitor the inhibition of PLD, the added volume of water (*see Subheading 3.2, step 4*) can be replaced by a volume of the selected compound. Since potential inhibitors are usually small organic compounds, they may be solubilized in dimethyl sulfoxide. This solvent can be used at concentrations up to 5% without interferences with the method. However, higher concentrations may negatively impact the 8HQ fluorescence signal as well as the PLD activity itself. Besides, since potential inhibitors are usually organic compounds, special cares should be taken to perform appropriate controls, in order to avoid signal artifacts, such as fluorescence quenching or Förster resonance energy transfer phenomenon.

10. Some microplate readers allow the setting of both excitation and emission slit width. When setting slit width, take special

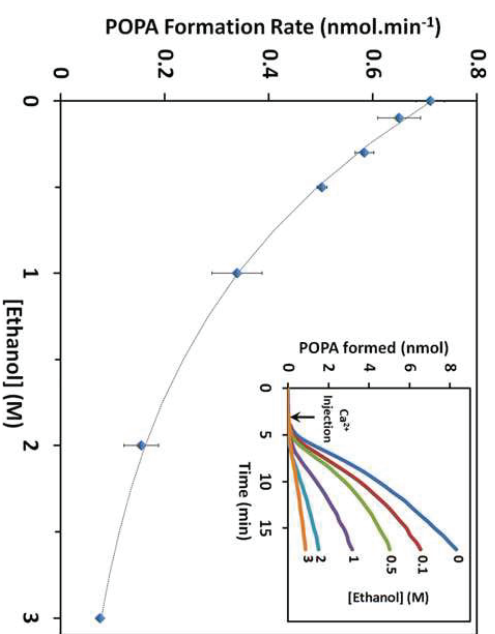


Fig. 3 Rates of POPA formed by VwPLD as a function of increasing concentrations of ethanol, using SDS/Triton X-100 mixtures containing POPC (0.26 mM) as the substrate. Values presented are the means \pm SD obtained from three independent experiments. The insert represents the corresponding kinetic curves of POPA formation

11. For reproducible and comparative results, do not change slit width from an experiment to another.
12. If possible, program the reader to automatically pause and move out the plate after background recording. This will allow the injection of CaCl_2 to start the reaction and to resume the recording, after the move in the plate. Alternatively, you can use injectors (if available) to dispense CaCl_2 in each well. However, automatic dispensing may create detergent bubbles, leading to signal artifacts.
13. The presented method has been optimized to monitor the activity of plant α -type PLDs, which require at least 20 mM of Ca^{2+} to be fully active. However, if the PLD to be characterized appears Ca^{2+} -independent, the reaction should be started (*see* Subheading 3.2, **step 4**) by injecting the PLD sample.
14. Rigorously, the calibration curve should be prepared by mixing increasing proportions of POPA along with decreasing proportions of the phospholipid used as the substrate. However, for routine experiment, the calibration curve can be prepared with POPA only, since 8HQ exhibits a low fluorescence signal in the presence of other phospholipids.

Acknowledgments

The French Ministry of Science and Education is gratefully acknowledged for the funding of Renaud Rahier and Yani Arhab. Funding of Houada Abba from La Ligue contre le cancer, comité de Haute-Savoie, is also gratefully acknowledged.

References

1. Selvy DE, Lavieat RR, Lindsley CW, Brown HA (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111(10):6064–6119. <https://doi.org/10.1021/cr200296t>
2. Yang SF, Freer S, Benson AA (1967) Transphosphatidylatation by phospholipase D. *J Biol Chem* 242(3):477–484
3. Morris AJ, Frohman MA, Enggebrecht J (1997) Measurement of phospholipase D activity. *Anal Biochem* 252(1):1–9. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2299>
4. Takaruna JF, Taylor KE (1991) A continuous spectrophotometric method for monitoring phospholipase D-catalyzed reactions of physiological substrates. *J Biochem Biophys Methods* 23(3):217–226
5. Krzyżanek M, Trzeciak HJ, Krzyżanek E, Malcedo A (2010) Fluorometric assay of oleate-activated phospholipase D isoenzyme in membranes of rat nervous tissue and human platelets. *Acta Biochim Pol* 57(3):369–372
6. D'Arrigo P, Piergiani V, Scarcelli D, Servi S (1995) A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Anal Chim Acta* 304(2):249–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00613-9](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00613-9)
7. Dippe M, Ulbrich-Hofmann R (2009) Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity. *Anal Biochem* 392(2):169–173. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.048>
8. Martin SF, DeBlanc RL, Hergenrother PJ (2000) Determination of the substrate specificity of the phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* via an inorganic phosphorus quantitation assay. *Anal Biochem* 278(2):106–110. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4420>
9. Rahier R, Noirel A, Abousallam A (2016) Development of a direct and continuous phospholipase D assay based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline. *Anal Chem* 88(1):666–674. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02332>
10. Shults MD, Imperiali B (2003) Versatile fluorescence probes of protein kinase activity. *J Am Chem Soc* 125(47):14248–14249. <https://doi.org/10.1021/ja0380502>
11. Ben Ali Y, Carrière E, Abousallam A (2007) High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from *cowpea* (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Expr Purif* 51(2):162–169. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.07.018>
12. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254

Article 5

Khatib, A., Arhab, Y., Bentebibel, A., Abousalham, A., and Noiriel, A. (2016).

Reassessing the Potential Activities of Plant CGI-58 Protein.

[PLoS One](#). 2016 Jan 8;11(1):e0145806. doi: 10.1371/journal.pone.0145806. eCollection 2016.

RESEARCH ARTICLE

Reassessing the Potential Activities of Plant CGI-58 Protein

Abdallah Khatib, Yani Arhab, Assia Bentebibel, Abdelkarim Abousalham, Alexandre Noiriel*

Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires UMR 5246 CNRS, Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

* alexandre.noiriel@univ-lyon1.fr



OPEN ACCESS

Citation: Khatib A, Arhab Y, Bentebibel A, Abousalham A, Noiriel A (2016) Reassessing the Potential Activities of Plant CGI-58 Protein. PLoS ONE 11(1): e0145806. doi:10.1371/journal.pone.0145806

Editor: Monika Oberer, University of Graz, AUSTRIA

Received: August 2, 2015

Accepted: December 9, 2015

Published: January 8, 2016

Copyright: © 2016 Khatib et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: AK was supported by grant #2012-11 from the Lebanese Association for Scientific Research, www.laser-lb.org. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); ATGL, Adipose triglyceride lipase; CGI-58, Comparative Gene Identification-58; DOPC, 1,2-Dioleoyl-sn-

Abstract

Comparative Gene Identification-58 (CGI-58) is a widespread protein found in animals and plants. This protein has been shown to participate in lipolysis in mice and humans by activating Adipose triglyceride lipase (ATGL), the initial enzyme responsible for the triacylglycerol (TAG) catabolism cascade. Human mutation of CGI-58 is the cause of Chanarin-Dorfman syndrome, an orphan disease characterized by a systemic accumulation of TAG which engenders tissue disorders. The CGI-58 protein has also been shown to participate in neutral lipid metabolism in plants and, in this case, a mutation again provokes TAG accumulation. Although its roles as an ATGL coactivator and in lipid metabolism are quite clear, the catalytic activity of CGI-58 is still in question. The acyltransferase activities of CGI-58 have been speculated about, reported or even dismissed and experimental evidence that CGI-58 expressed in *E. coli* possesses an unambiguous catalytic activity is still lacking. To address this problem, we developed a new set of plasmids and site-directed mutants to elucidate the *in vivo* effects of CGI-58 expression on lipid metabolism in *E. coli*. By analyzing the lipid composition in selected *E. coli* strains expressing CGI-58 proteins, and by reinvestigating enzymatic tests with adequate controls, we show here that recombinant plant CGI-58 has none of the proposed activities previously described. Recombinant plant and mouse CGI-58 both lack acyltransferase activity towards either lysophosphatidylglycerol or lysophosphatidic acid to form phosphatidylglycerol or phosphatidic acid and recombinant plant CGI-58 does not catalyze TAG or phospholipid hydrolysis. However, expression of recombinant plant CGI-58, but not mouse CGI-58, led to a decrease in phosphatidylglycerol in all strains of *E. coli* tested, and a mutation of the putative catalytic residues restored a wild-type phenotype. The potential activities of plant CGI-58 are subsequently discussed.

Introduction

The α/β hydrolase-type protein Comparative Gene Identification-58 (CGI-58), also called ABDH5, is found in various organisms, such as mammals [1], insects [1], nematodes [2], birds [3] and plants [4], and it plays an important role in lipid metabolism, at least in mammals and

glycero-3-phosphocholine; DOPG, 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol; DPPC, 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DPPG, 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol; ICT1, Increased Copper Tolerance 1; IPTG, Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; LPAAT, Lysophosphatidic acid acylCoA acyltransferase; LPGAT, Lysophosphatidylglycerol acylCoA acyltransferase; LPA, Lysophosphatidic acid; LPG, Lysophosphatidylglycerol; PA, Phosphatidic acid; PC, Phosphatidylcholine; PE, Phosphatidylethanolamine; PG, Phosphatidylglycerol; pgsA, Phosphatidylglycerophosphate synthase; PLA₂, Phospholipase A₂; PLD, Phospholipase D; plsC, 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase; POPG, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol; T7RP, T7 RNA polymerase; TAG, Triacylglycerol; TLL, *Thermomyces lanuginosus* lipase.

in plants. In these two clades of evolution, *CGI-58* mutations provoke various neutral lipid disorders characterized, predominantly, by TAG accumulation in non-fat storing cells, such as the mesophyll cells of plants and the non-adipose tissues of mammals (skin, muscle cells etc.). Originally, human *CGI-58* was described as being closely related to ICT1 (Increased Copper Tolerance 1) [5]. ICT1 is a yeast protein identified by functional screening as being involved in tolerance to copper toxicity [6] and shown, by microarray analysis, to participate in isooctane tolerance [7].

In plants, a mutation in the gene for *CGI-58* leads to an accumulation of TAG, with levels more than 10 times higher than in wild-type *Arabidopsis* leaves, a non-fat storing organ [4]. *CGI-58* co-regulates lipid homeostasis, too, by interacting with Peroxisomal ABC Transporter (PXA1) [8], a protein that serves as a transporter of various substrates into peroxisomes and which is also required for fatty acid catabolism by β -oxidation [9]. In addition to its role as a lipid turnover regulator, it has been shown that *CGI-58* also has an effect on polyamines, which have been described to be important molecules in growth and stress responses. In plants, *CGI-58* regulates polyamine metabolism [10] by interacting with spermidine synthase 1 (SPDS1). Structurally, plant *CGI-58* possesses at least two characteristic motifs. The first is a GX SXG motif found in lipases, containing a serine that, together with aspartate and histidine, is a member of a putative catalytic triad present in the α/β hydrolase-type family [1] to which plant *CGI-58* belongs. The second one is a putative HX₄D motif that is indispensable for acyltransferase activity [11]. An initial enzymatic study [12], published in 2009, showed that recombinant plant *CGI-58* purified from *E. coli* possesses several activities, the main one being the catalysis of a lysophosphatidic acid (LPA) acylCoA acyltransferase (LPAAT) reaction. This study also reported hydrolase activities for TAG and phosphatidylcholine (PC) that were much less than 0.01% of the acyltransferase activity [12].

In mammals, the mutation of *CGI-58* is responsible for the Chanarin-Dorfman syndrome, a neutral lipid storage disease with ichthyosis (NLSDI), characterized by TAG accumulation within the epidermis, brain and liver [13]. The protein *CGI-58* interacts with perilipin [14] and Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) activating, by a factor of 20, the lipolytic activity of ATGL [15]. In addition, the mammalian *CGI-58* protein possesses an acyltransferase motif, HX₄D, and harbors a mutated GXNXG lipase motif, whereby a suspected inactive asparagine replaces the catalytic serine [1]. This protein has been shown to participate in TAG homeostasis, for example in cardiac and skeletal muscles [16]. Another independent enzymatic study of *CGI-58* proteins has shown that mouse *CGI-58* expressed in *E. coli* was also able, as the plant homolog, to catalyze an acyltransferase reaction [17]. However, the same authors demonstrated later that this activity was, in reality, an artifact due to a contaminant from *E. coli* that co-purified with the protein [18]. The contaminant was identified as plsC, the enzyme responsible for phosphatidic acid (PA) synthesis in *E. coli* through the transfer of the acyl group from acylCoA to LPA. It would be easy to imagine that the LPAAT activity, previously described in recombinant plant *CGI-58* purified from *E. coli*, could originate from the same contaminant identified during the characterization of recombinant mouse *CGI-58* purified from *E. coli*, raising reasonable doubts regarding the potential activity of recombinant plant *CGI-58*. More surprising results have emerged from a recent paper describing lysophosphatidylglycerol acylCoA acyltransferase (LPGAT) activity for human *CGI-58*, expressed in mammalian cells [19], questioning the putative activities and involvement of plant and mammalian *CGI-58* in phospholipid synthesis.

Although the role of *CGI-58* as a regulator of lipid metabolism is quite clear, its catalytic activity is still elusive and questionable. In order to reassess the putative activities of plant *CGI-58*, we tested the phenotype of several *E. coli* strains defective in lipid metabolism. We used new *in vivo* approaches to demonstrate that recombinant plant *CGI-58* proteins are not able, to rescue an LPAAT mutant of *E. coli* nor to confer resistance to copper, which we have

demonstrated has a toxic effect alleviated by moderate LPAAT activity. Likewise, these recombinant plant proteins did not show any detectable *in vitro* LPAAT activity, using purified protein obtained with an optimized protocol under native conditions [18]. Here, we report that the expression of plant CGI-58 in another *E. coli* strain deficient in phosphatidylglycerol (PG) synthesis could not restore the synthesis of PG in this genetic background, compared to an authentic PG synthase as prokaryotic *pgsA*. Also, more surprisingly, plant CGI-58 expression leads to a decrease in PG but not in phosphatidylethanolamine (PE) content, suggesting a role for CGI-58 in PG catabolism. Interestingly, a decrease in PG was also observed in all the tested *E. coli* strains expressing plant CGI-58 and we found that this effect was potentially due to the catalytic activity of CGI-58, via a mutation of the seryl residue within the GX SXG lipase motif at position 199. Using the decrease in PG as a phenotype, we tested the involvement of several residues, and we were able to show that only the histidyl, and not the aspartyl, residue belonging to the HX₄D acyltransferase motif was implicated in the decrease of PG content.

Materials and Methods

Materials

The lipids dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), 1-palmitoyl, 2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG), 1-palmitoyl, 2-oleoylphosphatidylethanolamine and 1-oleoyllysoPG were purchased from Avanti Polar (Alabaster, Alabama, USA) and 1-oleoyllysophosphatidic acid, oleic acid, and triolein were purchased from Sigma Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France). Strains MN7 [20], SM2-1 [21], and MG1655 were obtained from the *E. coli* Genetic Stock Center (Yale University). BL21(DE3) strain and plasmids pACYC184 and pACYC177 were obtained from New England Biolabs. Plasmid pAR1219 was from Sigma Aldrich Chimie. *Mus musculus* CGI-58 (*MmCGI-58*) was a gift of Dr Zechner (University of Graz, Austria), and pET28a-*MmCGI-58*-12His (referred to as *MmCGI-58*) was a gift from Prof. Brasaemle (Rutgers, The State University of New Jersey, USA). The *Arabidopsis thaliana* full-length cDNA clone RAFL19-16-I19, coding *Arabidopsis* CGI-58 (*AtCGI-58*), was developed by the plant genome project at the RIKEN Genomic Sciences Center (Japan) [22,23]. All strains were grown at 37°C except MN7 and SM2-1, which were kept at 30°C. When necessary, LB plates contained 250 μM CuSO₄, 1 mM ABTS and 1 μM IPTG. Antibiotic concentrations were 0.1 μg/μL for kanamycin, 0.02 μg/μL for chloramphenicol, 0.05 μg/μL for streptomycin, 0.1 μg/μL for ampicillin and 0.01 μg/μL for tetracycline. Pre-coated TLC-sheets ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey Nagel) were used for lipids analysis in *E. coli*. Silica Gel G & GF Preparative Uniplate (Analtech, Newark, USA) were used for tests involving radioactivity. *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) was kindly provided by Dr S. Patkar (Novo-Nordisk, Copenhagen, Denmark). Phospholipase A₂, from porcine pancreas, and monoclonal anti-poly-Histidine coupled to peroxidase antibody were purchased from Sigma Aldrich Chimie. Radio-labeled lipids [dipalmitoyl-1-¹⁴C] phosphatidylcholine (111 mCi / mmol), [oleoyl-1-¹⁴C] oleoyl Coenzyme A (53.7 mCi / mmol) and [9,10-³H(N)] triolein (108 Ci / mmol) were all purchased from Perkin-Elmer.

Enzymatic Activities

LPAAT, phospholipase and triglyceride lipase activities were measured under the same conditions as described in [12], with some modifications. Basically, LPAAT activity was measured, in the presence of 50 μM of lysoPA and 10 μM oleoylCoA (13 000 dpm / test) in a 50 mM potassium phosphate buffer, at pH 7.0 for 10 minutes, and in a final volume of 100 μL. Phospholipase activity was quantified for 40 minutes, in the presence of 100 μM of dipalmitoylPC (20 000 dpm / test), in a 50 mM Tris HCl buffer, at pH 7.5, with 2 mM DTT and 1 μg of

proteins in a final volume of 100 μ L. The reaction mixture was sonicated for 5 min before adding the enzyme. Triglyceride lipase activity was measured in the presence of 100 μ M of triolein (100 000 dpm / test) and 100 μ M of sodium taurocholate in a 50 mM Tris HCl buffer, at pH 7.5 for 40 minutes, with 1 μ g of protein in a final volume of 100 μ L. Again, the reaction mixture was sonicated for 5 min before adding the enzyme. For all tests, the temperature was set to 32°C. After stopping the reaction by adding 100 μ L of 0.1 N HCl, lipid products were extracted, with the appropriate unlabeled substrates and expected unlabeled products as carriers using chloroform:methanol (2:1, v/v) and then separated by TLC on Silica Gel G & GF Preparative Uniplates with unlabeled, but identical products used as the reference.

Radiolabeled dipalmitoylPG (DPPG) was synthesized by transphosphatidylolation from [14 C]-dipalmitoylPC (DPPC) using phospholipase D (PLD) in the presence of glycerol. PC substrate, composed of 35.5 nmol of unlabeled DPPC and 4.5 nmol of [14 C]-DPPC, was sonicated for 10 min to form micelles in 150 μ L of buffer containing 0.83 mM SDS, 0.83 mM Triton X100, 20 mM CaCl₂, 500 mM glycerol and 50 mM Tris-HCl, pH 8. 200 ng of purified recombinant *Vigna unguiculata* PLD [24] was added and the reaction mixture was incubated for 1 h at 30°C. The reaction was terminated by adding 100 μ L of 0.1 N HCl and lipids were extracted with a mix of chloroform:methanol (2:1, v/v). The lipids were then separated by TLC using a mix of chloroform:methanol:acetic acid (65:25:10, v/v/v). [14 C]-DPPG was scraped from the silica plate, re-dissolved in chloroform:methanol (2:1, v/v), filtered and then stored at -20°C until further use. Assuming that enzymatic conversions of labeled and unlabeled PC were equivalent, the specific activity of radiolabeled DPPG was then calculated as 250 dpm / pmol.

The putative PG acylhydrolase activity of recombinant CGI-58 protein was tested using either the purified truncated version of AtCGI-58 (AtCGI-58 Trc) or cell extracts of *E. coli* expressing AtCGI-58 Trc or the S199N mutant version. A reaction mixture containing 10 nmol of DOPG and 20 pmol of [14 C]-DPPG (250 dpm/pmol) was dispersed, by sonication, for 5 min in a final volume of 100 μ L of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. Next, 7 μ g of purified AtCGI-58 Trc or 10 μ g of proteins from the cell extract were added and the reaction mixture was incubated, at 30°C, for 2 h for the purified fraction or 30 min for the cell extract. Reactions were terminated by adding 100 μ L of 0.1 N HCl. Lipids were extracted with chloroform:methanol (2:1, v/v) and separated, by TLC, using a chloroform:methanol:acetic acid (65:25:10, v/v/v) solution. The area containing free fatty acids was scraped and then quantified by scintillation counting.

Cloning

cDNAs coding for MmCGI-58 and for full-length (AtCGI-58 FL) or truncated AtCGI-58 (AtCGI-58 Trc) were amplified by PCR with primers 01 and 02, 03 and 04, 03 and 05, respectively. The primers are listed in Table 1. All constructs harbor an *Nde*I site and a sequence coding for a 6-Histidine tag at the 5' end, together with a *Not*I restriction site at the 3' end. PCR products were digested with *Not*I and *Nde*I, purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), and then ligated into the pET28b plasmid (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) digested by the same restriction enzymes. *CotA* was amplified with primers 18 and 19, harboring a *Pci*I and a *Not*I site, respectively, and cloned in the same way except that *Pci*I was used instead of *Nde*I for digesting the PCR product. All constructs were verified by sequencing (Eurofins MWG, Ebersberg, Germany).

The pYAT7 plasmid (8694 bp) (accession number KT970713) was constructed by excising the *lacUV5-T7 RNA polymerase (T7RP)* fragment from the pAR1219 plasmid with *Bam*HI, then cloning it into the *Bam*HI site of the plasmid pACYC184. The orientation of the insert was confirmed by sequencing the construct with primer 06 (Table 1), located at the 5' end of

Table 1. List of primers used. Restriction sites are underlined, start codons are in bold, and mutated bases for site-directed mutagenesis are italicized.

Primer name	Target	Sequence 5'→3'
01	MmCGI-58 Fwd	CAGTCAAC ATG TTAGCGATGGCGGCG
02	MmCGI-58 Rev	TGCTGCGGCCGCTCAGTCTACTGTGTGGC
03	AtCGI-58 FL Fwd	GTCACAT ATG AACTTGAGCCGTTTGTGCTT
04	AtCGI-58 FL and Trc Rev	TGCTGCGGCCGCTAAACCAATCGTAGACC
05	AtCGI-58 Trc Fwd	GTCACAT ATG AAATCAAGATGGAAAATTTGTG
06	TetC Fwd	ATGAAATCTAACAATGCGCTCATC
07	T7RNA polymerase Rev	GTGCAATCATCTTAGGGAGTA
08	plsC Fwd	TCACC ATG GTATATATCTTTTCGTCTATTATTACCG
09	plsC Rev	TGCTGCGGCCGCTTAAACTTTCCGGCGGCTTC
10	pgsA Fwd	TCAAC ATG TCATTTAATATCCCTACGTTGCTTAC
11	pgsA Rev	TGCTGCGGCCGCTCACTGATCAAGCAAATCTGCA
12	AtCGI-58 Trc S199N Fwd	CATAATTTTGAGGCTATGTTGCTAAA
13	AtCGI-58 Trc S199N Rev	ATAGCCTCCAAAATATGTCTTAATAG
14	AtCGI-58 Trc H379A Fwd	CCACAGGGTGGTGCCTTTGTGTTCATA
15	AtCGI-58 Trc H379A Rev	TATGAACACAAAAGCACCACCCTGTGG
16	AtCGI-58 Trc D384A Fwd	TTTGTGTTTCATAGCCAACCCAATGGT
17	AtCGI-58 Trc D384A Rev	ACCAATTGGGTTGGCTATGAACACAAA
18	CotA Fwd	CAGTCAAC ATG TCACTTGAAAATTTGTGGATGCT
19	CotA Rev	GATGCTGCGGCCGCTTATTTATGGGGATCAGTTATATCC

doi:10.1371/journal.pone.0145806.t001

trcR. The sequence between the *lacI* promoter and the *T7RP* open reading frame was also obtained from sequencing with the reverse primer 07 (Table 1), located at the 5' end of *T7RP*. The exact size of the plasmid was calculated from the aforementioned sequences obtained from sequencing reactions, using information provided by [25], and from the pACYC184 sequence (accession number X06403.1).

In order to generate pAKT7 (accession number KT970712), a vector conferring resistance to ampicillin and allowing the inducible expression of the T7RNA polymerase, the pYAT7 plasmid was digested by HindIII and SalI and the pACYC177 plasmid was digested by HindIII and XhoI. Since *Sall* and *XhoI* are compatible sites, the fragment containing the *T7RNA polymerase* sequence, roughly 5000 bp long and resulting from digested pYAT7, was then ligated into the kanamycin resistance cassette of the pACYC177 plasmid.

The gene coding for *plsC* was amplified from the genome of the *E. coli* strain BL21(DE3), by PCR, using primers 08 and 09 (Table 1) or from the strain SM2-1 for the *plsC**G39E variant. Amplification was performed using KOD polymerase (Novagen). This strategy generates a construct with the restriction sites *NcoI* and *NotI* at the 5' and 3' ends, respectively. The PCR product was then ligated into the dephosphorylated pET28b(+) vector digested with *NcoI* and *NotI*. The gene coding for *pgsA* was amplified from the *E. coli* MG1655 strain, by PCR, using primers 10 and 11 (Table 1) and Q5 polymerase (Biolabs, Evry, France). The fragment generated, containing a *PciI* and a *NotI* restriction site at the 5' and 3' ends, respectively, was further ligated into the pET28b(+) plasmid digested by *NcoI* and *NotI*. Both constructs were verified by sequencing, as described above.

Expression

Plasmids were transferred either into SM2-1 and MN7 strains previously transformed with the pYAT7 vector or directly into the BL21(DE3) strain. All transformations were carried out by

electroporation using a Bio-Rad Micropulser. The resulting transformants were grown on LB plates with appropriate antibiotics at 37°C for the BL21(DE3) strain or at 30°C for the others.

For protein expressions, clones were grown overnight in LB medium, containing appropriate antibiotics, and at the temperature described previously. Cultures were then diluted 10 times and grown until the OD_{600 nm} reached 0.6–0.8. Induction, for 5 h, was initiated by the addition of 1 mM IPTG.

For SDS-PAGE analysis, the conditions were identical except that IPTG was added for 3 h at 30°C. The expression level was tested by loading the total proteins extracted from an equivalent of 100 µL of culture at an OD_{600 nm} of 1.

To prepare cell extracts, containing soluble AtCGI-58, MmCGI-58 or plsC, 100 mL of culture was harvested by centrifugation. The pellet was then incubated with 1 mg/mL of lysozyme, for 30 min at 4°C, in lysis buffer containing 50 mM NaH₂PO₄ and 300 mM NaCl at pH 7.4. Cells were disrupted by probe sonication. Cell debris were then removed, by centrifugation at 10 000 x g for 20 min, and the soluble fraction was used for enzymatic tests or purification.

Purification

The soluble fraction, obtained as described above, was incubated with TALON[®] Metal Affinity Resin (Clontech). An extract containing AtCGI-58 was incubated, for 3 h at 4°C, in a buffer composed of 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, and 20 mM imidazole at pH 7.4. An extract containing MmCGI-58 was incubated overnight at 4°C in a buffer consisting of 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM KCl, 30 mM imidazole, 1 mM DTT and 10% glycerol at pH 7.5 (Prof. Braesaemle, Rutgers, The State University of New Jersey, USA; personal communication). Resin was then recovered, by centrifugation, and washed with the same buffers as described previously except that the imidazole concentration was increased to 25 mM for AtCGI-58 and to 100 mM for MmCGI-58 purification. Any bound proteins were then eluted with the same buffers, containing 250 mM imidazole, and desalted on PD-10 columns equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 8, plus 10% (v/v) glycerol. The concentration of purified protein was estimated by measuring absorbance at 280 nm using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The authenticity of MmCGI-58 was checked by mass spectrometry following tryptic digestion (Centre d'Analyses Protéomiques IMM-CNRS, Marseille, France). For plant CGI-58, proteins were transferred, after SDS-PAGE, onto nitrocellulose membranes and the presence of the N-terminal His-tag was verified by development with a monoclonal anti-polyHistidine-peroxidase antibody.

Mutagenesis

AtCGI-58 mutations were generated using the GeneArt[®] Site-Directed Mutagenesis PLUS system from Invitrogen. The cDNA coding for the truncated version of AtCGI-58 and cloned into the pET28b vector was used as a template. Primers, described in [Table 1](#), were used to substitute H379 and D384 with alanyl residues, and S199 in the lipase motif of AtCGI-58 was replaced by an asparaginyl residue, as found in MmCGI-58.

Lipid extraction

Total lipids were extracted using the method of Bligh and Dyer, as modified by Ames [26,27]. *E. coli* cells were induced in 25 mL of culture, as previously described for protein expression except that induction was reduced to 4 hours. Cells were then harvested with a 4 000 x g centrifugation for 10 min, the pellet was re-suspended in 0.8 mL of PBS, and 2 mL of methanol and 1 mL of chloroform were added with thorough mixing. After 1 h at room temperature, 1 mL of chloroform and 1 mL of PBS solution were added and then the phases were thoroughly mixed.

After a brief low-speed centrifugation, the resulting organic phase was carefully removed, dried under N_2 , re-suspended in a small volume of chloroform and then analyzed for individual phospholipids. Two-dimensional thin layer chromatography, on pre-coated TLC-sheets ALU-GRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey Nagel), was used to separate the different lipids. For the first dimension, a solution of chloroform / methanol / water (65:25:4, v/v/v) was used and then a chloroform / methanol / acetic acid (65:25:10, v/v/v) solution was employed for the second dimension. After drying the plates, lipids were visualized by exposure to iodine vapor.

Lipid quantification

PG and PE were quantified by LC/MS/MS. Total lipids extracted as mentioned previously, were re-suspended in 2.5 mL of methanol. An aliquot (200 μ L) of each sample was filtrated, dried under N_2 , re-suspended in 200 μ L of acetonitrile / methanol / chloroform (18:1:1, v/v/v) and then 10 μ L of this sample were injected for analysis. The LC system consists of two LC-30AD binary pumps, a SIL-30AC autosampler and a CTO-20AC column oven (Shimadzu). Samples were separated on a CORTECS HILIC column 2.7 μ m 4.6x150 mm from Waters.

The gradient elution used eluents A and B, where A was 95/5 acetonitrile/water with 10 mM ammonium formate and B was 50/50 acetonitrile/water with 10 mM ammonium formate. The column was equilibrated for 2 min with 0% of B prior to injection of the sample. The percentage of B was held constant for 2 min and it was then linearly increased from 0 to 50% over a period of 8 min. The flow rate was set to 0.5 mL/min and the column temperature to 30°C. The QTRAP 4500 mass spectrometer, equipped with a heated ESI source (ABSciex) was operated in positive mode. Nitrogen was used as both the sheath and the curtain gas and it was set to 20 and 40 psi, respectively. The sprayer voltage was set at 4500 V and the collision gas at medium. The vaporized temperature was set at 350°C.

For the neutral loss scan experiments, the MS/MS scan consists of a search for neutral loss of 189 Da for PG analysis, and 141 Da for PE. The mass range was from m/z 600 to 1000 for PG and PE, and the scan rate was 1000 Da/s for each experiment. The declustering potential was set to 95, entrance potential to 10, collision energy to 37 and collision cell exit potential to 13 for all the experiments. The quantity of PG and PE was calculated based on a 28:0 PG and 36:2 PE standard curve, respectively.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm S.D. Statistical significance was determined by the Student's unpaired t-test (two-tailed). Samples were considered to be significantly different for $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***)

Results and Discussion

Development of a new set of plasmids allowing *E. coli* expression of genes cloned into pET plasmids

Constructs designed for protein overexpression in *E. coli* are frequently made into pET plasmids (Novagen), cloned 3' to the T7 phage promoter. These pET plasmids confer resistance to either kanamycin or ampicillin and have a pBM1 origin of replication. However, although these plasmids are useful in BL21(DE3) strains hosting chromosomal *T7RP*, they are of no use in other genetic backgrounds lacking *T7RP*. *T7RP* is indispensable for T7 promoter recognition, especially in *E. coli* mutants that are potent tools for complementation and for tests on proteins of unknown function. Expressing proteins in these valuable strains necessitates fastidious constructs and sub-cloning into other plasmids with a different promoter. In order to bypass these

problems, we decided to clone the *T7RP* into plasmids that had a compatible origin of replication, such as p15A and, at the same time, provide a different antibiotic resistance. Hence, we excised *lacI* and *T7RP* from the pAR1219 vector with BamHI and sub-cloned this fragment into the *tet* gene of a pACYC184 plasmid, previously digested with BamHI. In this way, we abolished the tetracycline resistance and then generated the pYAT7 plasmid with resistance to chloramphenicol only [Fig 1A]. *lacI* and *T7RP* were then excised from pYAT7, with SalI and HindIII, and the fragment was sub-cloned into the kanamycin resistance gene of the pACYC177 plasmid digested with XhoI and HindIII. *SalI* and *XhoI* sites have compatible ends and we then formed the pAKT7 plasmid, in this case conferring resistance to ampicillin [Fig 1A].

Recombinant laccase *CotA* has been previously shown to colorize the medium when successfully expressed in *E. coli* [28]. To prove the effectiveness of the two novel plasmids we had constructed, we transformed the MG1655 strain deficient in *T7RP* with one of these two plasmids and *CotA* was cloned into the pET28b. When transformed with pET28b-*CotA*, coloration due to ABTS oxidation by *CotA* was observed only in the BL21(DE3) strain containing a chromosomal *T7RP* [Fig 1B, left panel], and coloration was absent in MG1655, which does not contain *T7RP*. Coloration could be observed again when MG1655 was transformed with the construct pET28b-*CotA*, and either pYAT7 or pAKT7, but not with the native plasmids pACY177 or pACYC184 [Fig 1B, central and right panels]. This demonstrates that *T7RP* was both functionally expressed and allowed the expression of the recombinant protein whose corresponding gene was cloned into pET28b. To confirm that the level of expression was comparable to that found in BL21(DE3), total proteins from these transformants, grown with or without IPTG, were extracted and separated on SDS-PAGE [Fig 1C, left part]. As expected, the expression of recombinant *CotA* (theoretical molecular weight 58.5 kDa) was shown to be IPTG dependent and its expression level was quite similar, though slightly lower, in the common strain MG1655, transformed with either pYAT7 or pAKT7, compared to commercial BL21(DE3). Both plasmids could now be used in any strain deficient in *T7RP* in order to express *in vivo* genes cloned under the T7 promoter. They would be powerful tools for overexpressing recombinant proteins and to test for functional complementation with the same construct cloned into pET plasmids.

A comparison of plant and mammalian CGI-58 primary sequences reveals that they differ, in particular with regard to their N-terminal regions, as plant CGI-58 typically has an extension of about thirty residues. We searched for a CGI-58 homolog from different plant species of all taxa, from Mosses through to Eudicots. It was quite remarkable that the sequence homology begins 50 residues after the first methionine, suggesting divergent evolution of the N-terminal region and a strong conservation of the central and C-terminal parts [S1 Fig]. Bioinformatic software, such as TargetP [29], projects a transit peptide, either chloroplastic or mitochondrial, for CGI-58 for 24 out of the 28 plant sequences examined. Admittedly, plant CGI-58 was described as being cytosolic [4], but it was also found on the surface of peroxisomes [8]. Consequently, to avoid a probable misfolding of the protein expressed in *E. coli* due to a potential uncleaved transit or targeting peptide, we decided to test two versions of the *Arabidopsis* protein: full-length and one truncated at position 43.

We expressed the mouse CGI-58, plus the truncated and the full-length versions of CGI-58 from *A. thaliana*, in either BL21(DE3) or SM2-1 strains, the latter being deficient in *T7RP*, but previously transformed with a pYAT7 plasmid. Recombinant proteins were purified under native conditions according to published [18] and unpublished (Prof. Brasaemle, personal communication) protocols for mouse CGI-58 and an optimized protocol for plant CGI-58 (this study). Fractions were considerably enriched in target proteins, compared to crude extracts, and we were able to purify enough recombinant plant protein due to the expression capacity of the pYAT7 vector (24 to 36 micrograms of protein were purified per liter of culture). After SDS-PAGE, the fractions appeared to be enriched principally in the targeted protein [Fig 1D].

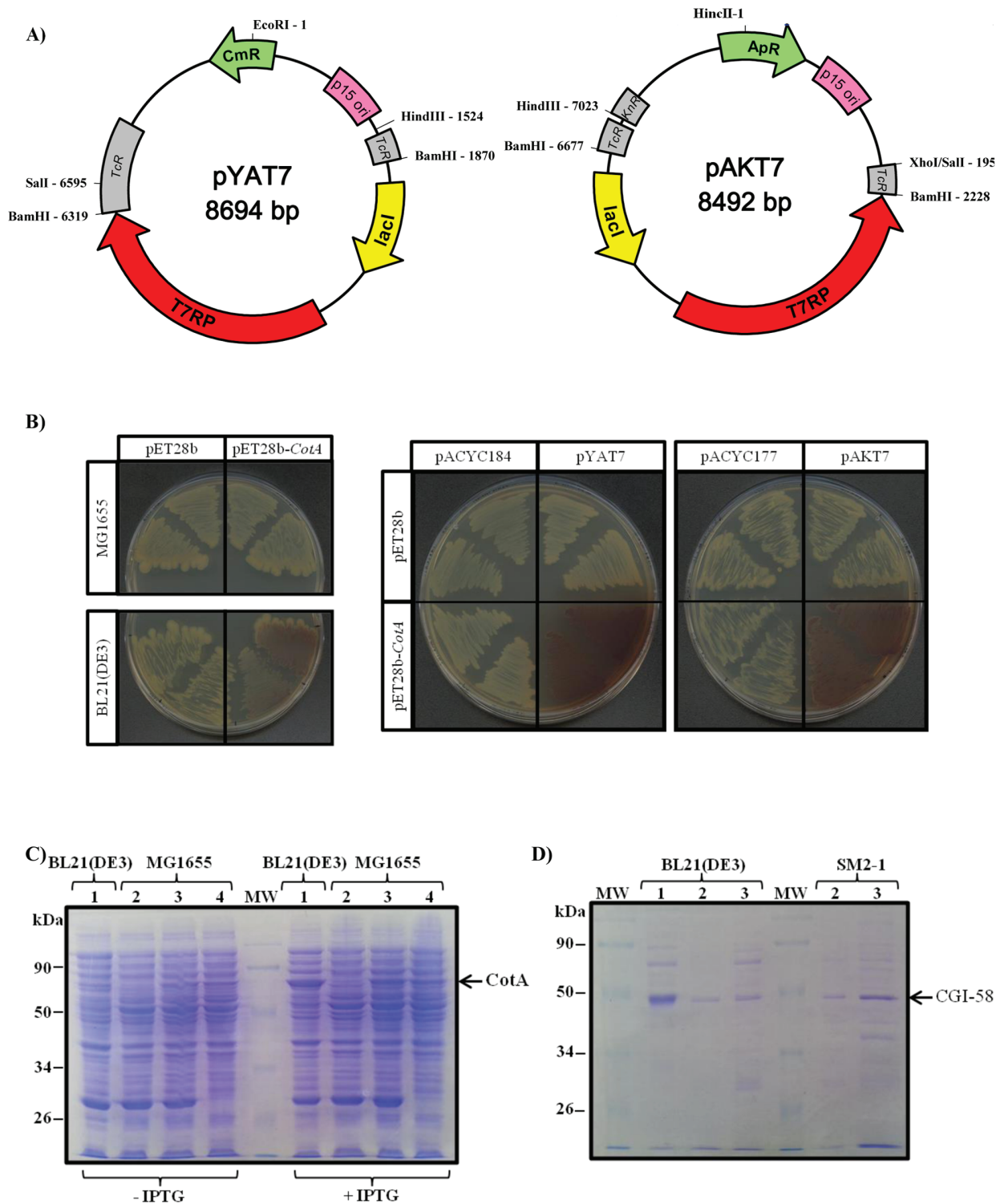


Fig 1. A new set of plasmids containing *T7 RNA polymerase* and with a replication origin compatible with the pET plasmid series, allowing expression and purification of recombinant proteins in *E. coli*. A) Maps of vectors pYAT7 and pAKT7 containing *T7 RNA polymerase* cloned into plasmids harboring the p15A origin of replication. Left panel: pYAT7 plasmid with *T7RP* cloned into the *Bam*HI site of the pACYC184 backbone, thus conferring resistance to chloramphenicol. Right panel: pAKT7 plasmid with *T7RP* cloned into the *Hind*III-*Sall* sites of the pACYC177 backbone, thus conferring resistance to ampicillin. Active and inactive antibiotic resistance genes are shown in green and in grey, respectively. Remarkable restriction sites

are shown. B) Functional use of pYAT7 and pAKT7 plasmids for expressing the recombinant CotA protein in MG1655, a T7RP deficient *E. coli* strain. Left panel: coloration due to ABTS oxidation in different *E. coli* genetic backgrounds necessitates both the presence of CotA and T7RP. MG1655 or BL21(DE3) strains were either transformed with void pET28b or with pET28b-CotA. Central and right panels: functional expression of CotA in MG1655 strain transformed with either pYAT7, pAKT7 plasmids or native pACYC184 or pACYC177 plasmids. LB plates contain 250 μ M CuSO₄, 1 mM ABTS and 1 μ M IPTG. All pictures were taken 3 days after streaking. C) Functional expression of CotA cloned into pYAT7 and pAKT7 plasmids with analysis by SDS-PAGE of total proteins extracted from the recombinant strain. Extracts were analyzed before or after a 3 h induction with IPTG. Lane 1: strain BL21(DE3) transformed with pET28b-CotA. Lane 2 and 3: strain MG1655 transformed with pYAT7 and either void plasmid (lane 2) or pET28b-CotA (lane 3). Lane 4: strain MG1655 transformed with pAKT7 and pET28b-CotA. The expected size of CotA (58.5 kDa) is indicated. D) Analysis by SDS-PAGE of purified CGI-58, from plant or mouse, expressed either in BL21(DE3) strain or SM2-1 and transformed with pYAT7. 5 μ g of recombinant MmCGI-58 and 2 μ g of recombinant plant CGI-58 were loaded onto each lane. Lane 1: MmCGI-58 (42.0 kDa), Lane 2: truncated version of AtCGI-58 (44.5 kDa), Lane 3: full-length version of AtCGI-58 (47.8 kDa). The authenticity of purified recombinant MmCGI-58 was verified by mass spectrometry after tryptic digestion, and for recombinant plant CGI-58 a Western-blot with monoclonal Anti-polyHistidine antibody was performed.

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g001

Reassessing the phosphatidic acid synthase activity of recombinant plant CGI-58

Like the mammalian protein, recombinant plant CGI-58 has been previously described as catalyzing an LPAAT reaction. However, activity of the mammalian protein was recently shown to be due to an *E. coli* contaminant that co-purified with the protein [18]. In order to reevaluate the plant enzymatic activity, we tried to complement the SM2-1 strain deficient in LPAAT activity as a result of the *plsC* mutation. Compared to the wild-type strain SM105, this *plsC* mutant is unable to grow at 42°C [Fig 2A]. Complementing this strain with an enzyme catalyzing the synthesis of PA restores growth at this permissive temperature [30,31,32,33]. We co-transformed CGI-58 constructs, cloned into the pET28b vector, with the pYAT7 plasmid in the SM2-1 strain and then performed a serial dilution of the cultures. The void plasmid was used as a first negative control. As a positive control, we cloned *plsC* from BL21(DE3) and as a second negative control we used *plsC**G39E from SM2-1. This mutated gene coding for a G39E variant of *plsC* is responsible for the temperature sensitivity observed at 42°C [34]. The expression of different CGI-58 constructs did not restore growth at 42°C in the way that the expression of authentic *plsC* did, whereas expression of the *plsC* variant G39E showed no difference compared to the void control [Fig 2B]. Clones expressing AtCGI-58 FL behaved in the same way as those transformed with the truncated version of the protein (data not shown). This demonstrates that an active LPAAT, such as *plsC*, can be detected in this expression system and that strains transformed with different CGI-58s behave as negative controls.

CGI-58 was previously identified by its homology with yeast ICT1 (Increased Copper Tolerance 1) [5]. Since an *ict1* mutation causes copper sensitivity [6], one could hypothesize that CGI-58 proteins participate in copper tolerance or detoxification too. We first decided to examine the sensitivity of strain SM2-1 to copper. Interestingly, this strain deficient in LPAAT activity is considerably more sensitive to copper than the SM105 wild-type strain, proving that *plsC* confers an advantage in regards to copper toxicity and that lipid composition is related to copper permeability [Fig 2A]. When different CGI-58 constructs were expressed in the presence of 3 mM of copper, no difference in growth could be observed compared to the negative controls under these conditions. AtCGI-58 FL and murine CGI-58 with 6 (data not shown) or 12 His-tag behaved in the same manner.

However, a clone expressing *plsC* was more resistant to copper than the control and a clone expressing the mutated version of *plsC* was comparable in behavior to the void control [Fig 2B]. Under these conditions, no complementation of this strain could be observed with different CGI-58 constructs, especially with those of plants. The same results were obtained when transformants were grown in liquid medium with 50 μ M of copper (data not shown). An involvement of PA synthesis has already been described in vancomycin resistance in *E. coli* [35], but this is the first report, to our knowledge, of a direct link between PA synthesis and copper sensitivity.

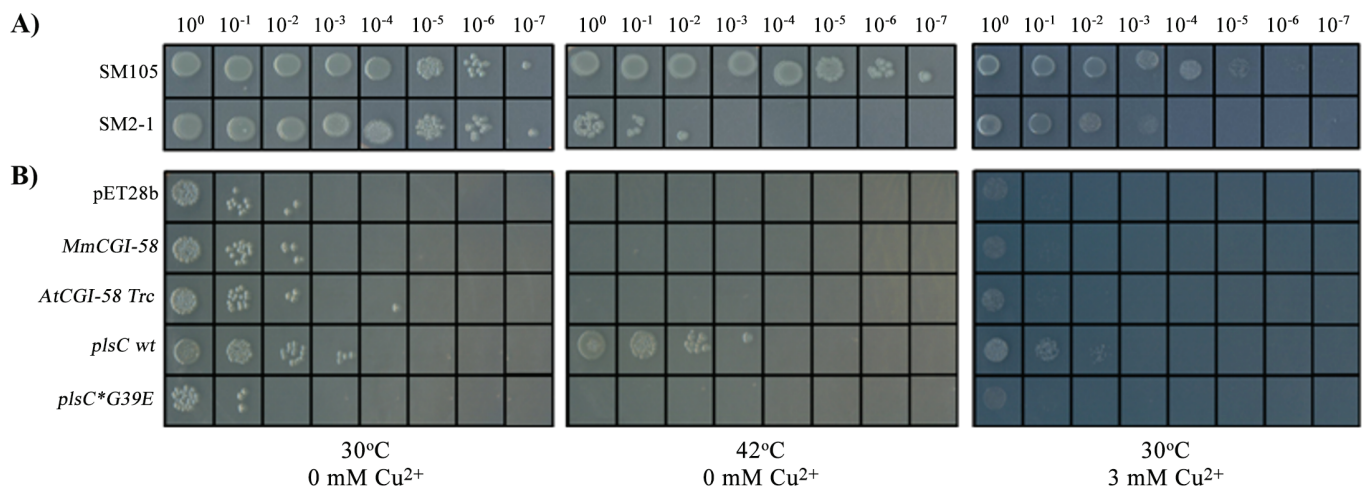


Fig 2. Absence of lysphosphatidic acid acylCoA acyltransferase activity of plant CGI-58 protein shown by functional complementation. A) Phenotype of SM2-1 and SM105 strains, grown at 30 or 42°C in the presence or absence of 3 mM of copper sulfate after serial dilution. B) Serial dilutions of the SM2-1 strain containing the pYAT7 plasmid and transformed with *CGI-58* constructs or controls: void pET28b vector, *MmCGI-58*, *AtCGI-58 Trc*, *plsC wt*, or *plsC*G39E*. Liquid cultures were incubated for 4 hours with 100 μM IPTG prior to dilution and plating. LB plates contained, in addition to antibiotics, 100 μM IPTG. All pictures were taken 2 days after plating.

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g002

Since CGI-58 is described as being located in the cytosol [4] and *plsC* has been shown to be membrane-bound by the presence of a putative anchor in its N-terminal region [36], allowing for co-localization of the protein and its substrates, a chimera was made of the first 40 amino acids of *plsC* fused to the N-terminal region of mouse CGI-58. No difference under the temperature and copper toxicity conditions described above was observed compared to native CGI-58 and negative controls (data not shown). This corroborates the results obtained by other researchers [18]. We observed, after SDS-PAGE analysis of proteins purified from membrane fractions, that mouse CGI-58 is already partially membrane-bound in *E. coli* and that adding the first 40 amino acids of *plsC* leads to a similar amount of mouse CGI-58 protein in the membrane fraction (data not shown).

Considering the possibility that the plant enzyme and its substrates are not close enough together, *in vivo*, to permit a catalytic reaction, we next tried to measure *in vitro* LPAAT activity with a purified protein. Our first attempts to measure the activity, as described previously [12], were unsuccessful. As detailed by Ghosh *et al.*, recombinant plant CGI-58 was purified from inclusion bodies, under denaturing conditions with 6 M urea, and tested without any proper refolding step, but it is possible that the refolding was immediate when the protein was mixed in the reaction buffer. Consequently, we tried to measure LPAAT activity using recombinant plant CGI-58 purified under native conditions from BL21(DE3) [Fig 1D] and we were able to detect, by LC-MS, a weak PA synthesis over time. However, at the same time as we were performing this experiment, McMahon *et al.* showed that the previously described LPAAT activity for mouse CGI-58 was emanating, in fact, from *E. coli* *plsC* that co-purifies with CGI-58 [18]. We decided to continue with the expression of CGI-58 and *plsC* in SM2-1 to minimize proven contamination during purification from *plsC*. We tested crude extracts and proteins purified under native conditions for LPAAT activity. Although an increase in activity was measured in a crude extract from SM2-1 cells transformed with *plsC*, no increase in LPAAT activity was observed in any other samples tested [Fig 3A]. The activity in samples expressing recombinant plant CGI-58 was the same as that of the control and, notably, no activity could be detected with recombinant plant purified protein compared to the mock sample [Fig 3B].

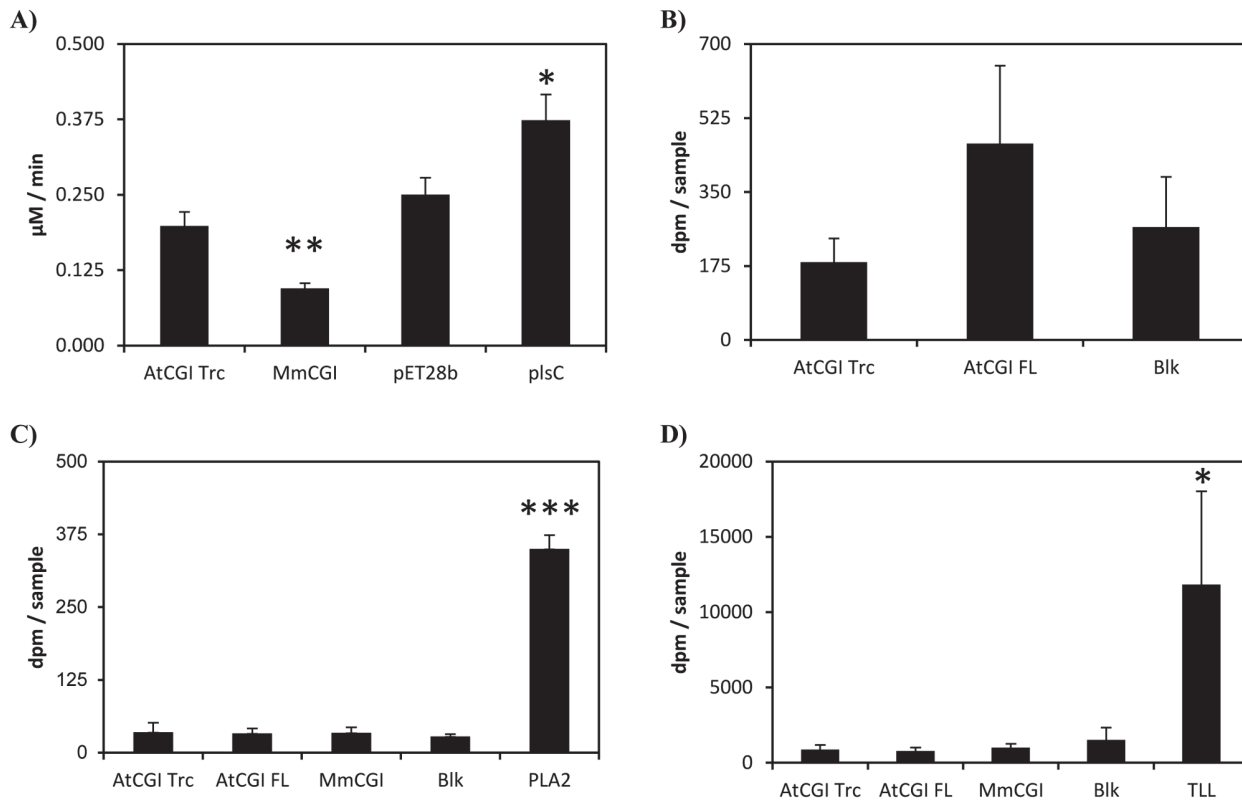


Fig 3. Reassessing the potential activities of recombinant plant CGI-58 using enzymatic tests. A) Measurement of PA formation, through LPAAT activity, using 5 µg of protein from a crude extract of SM2-1 cells transformed either with the void pET28b vector, or the truncated version of *AtCGI-58*, or *MmCGI-58* or *plsC*. Activities were corrected from the blank values obtained with samples tested in the absence of protein; blank values represent less than 10% of the dpm counted with other samples. Values ± SD are the mean of three independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs pET28b). The experiment was repeated with similar results. B) Measurement of total dpm found in the PA fraction after TLC separation with purified recombinant plant CGI-58. LPAAT activity was tested with samples incubated for 10 min in the presence of 1 µg of a purified full-length or truncated version of *AtCGI-58* expressed in the SM2-1 strain. Blanks (Blk) were prepared with no protein incubation. Values ± SD are the mean of three independent measures. The experiment was repeated with similar results. C) Measurement of the phospholipase activity of purified recombinant plant CGI-58. (D) Measurement of the triglyceride lipase activity of purified recombinant plant CGI-58. For both figures, the total dpm counted in the free fatty acid fraction after TLC separation is shown. Samples were incubated for 40 min in the presence of 1 µg of a purified full-length or truncated version of *AtCGI-58* expressed in the SM2-1 strain. Porcine pancreatic phospholipase A₂ (1 ng) and triglyceride lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (100 ng) were used as positive controls. Blanks (Blk) were prepared with no protein incubation. Values ± SD are the mean of three independent measures. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (vs blank). The experiment was repeated with similar results.

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g003

Interestingly, activity in the crude extracts of samples expressing MmCGI-58 was consistently and repeatedly half of that observed in the control, suggesting that MmCGI-58 could modulate *plsC* activity directly or indirectly and it could have an effect on lipid metabolism in *E. coli*.

We tested the phospholipase and TAG lipase activities of recombinant plant CGI-58 purified under native conditions with porcine pancreatic PLA₂ and TLL, two well-known lipolytic enzymes, as positive controls for each activity. Although fatty acids were freed from PC and TAG by PLA₂ and TLL, respectively, no free fatty acids could be detected as a result of recombinant plant CGI-58 incubation, as shown in Fig 3C and 3D. No differences were observed between all the samples tested and, in particular, the radioactivity measured with purified recombinant plant CGI-58 was the same as the background measured in the blank prepared without any enzyme. Whilst the LPAAT activity, previously described for recombinant plant CGI-58 [12], may have resulted from *plsC* contamination, the absence of phospholipase and TAG lipase activities with our recombinant plant CGI-58 proteins, purified under native

conditions in our study, is puzzling. These enzymatic activities have been described [37,38], or suspected [39], in *E. coli*, but, to our knowledge, no protein has been identified or characterized so far, rendering the hypothesis of another contamination improbable but still possible. However, recombinant plant CGI-58 was previously purified from urea-solubilized inclusion bodies [12], therefore it is still possible that the refolding step in an urea-free buffer leads to conformational changes affecting the enzymatic properties of the protein. More probably, traces of urea resulting from purification under denaturing conditions may have increased these weak enzymatic activities, dilute denaturants, such as urea, being well-known activators of catalytic activities [40,41,42,43].

Assaying the phosphatidylglycerol synthase activity of recombinant plant CGI-58

Since it has recently been suggested that mammalian CGI-58 catalyzes PG synthesis [19], we decided to test the activity of plant and mouse CGI-58 in *E. coli* with functional complementation. We used the MN7 strain, deficient in PG synthesis, where there is a mutation in *pgsA*, which provokes a phenotype with temperature-sensitivity that can be alleviated by expressing a phosphatidylglycerate synthase [20,44]. Even though *pgsA* encodes a CDPdiacylglycerol: *sn*-glycerol-3-phosphate phosphatidyltransferase and not a lysophosphatidylglycerol acylCoA acyltransferase, lysoPG is still found in *E. coli* [45,46]. Consequently, a lysoPG acyltransferase, or any enzyme catalyzing the formation of PG from intermediates present in *E. coli*, may overcome this lethal phenotype. When expressed in the MN7 strain with the pYAT7 plasmid, which allows the expression of genes cloned into the pET28b plasmid, none of the clones expressing the different CGI-58 constructs could grow at 42°C (data not shown). This demonstrates that, under these conditions, CGI-58s seem not to be involved in PG synthesis *in vivo*.

However, expressing *pgsA*, cloned into the pET28 plasmid in the MN7 strain, did not give a clear positive control at 42°C, potentially due to the toxicity of PGSA expression or activity that we observed at 30°C with this particular clone. In order to detect a putative PG synthesis in all the clones tested, we decided to analyze the lipid content of this PG-deficient strain using 2-D TLC [47]. Compared to the negative control transformed with the void vector, the PG spot was only slightly darker after diiodine detection of the lipids extracted from the strain transformed with *pgsA* [Fig 4A]. This might explain why the results of the complementation were not definitive under our conditions. One obvious explanation is the probable toxicity due to *pgsA* overexpression—it is difficult to propagate this particular clone because it has a short survival period on plates after transformation. Surprisingly, although the amount of PG appeared to be the same in the clone transformed with mouse CGI-58, compared to the control, this amount was clearly lower in the clone transformed with the full-length version of plant CGI-58, and considerably lower in the clone transformed with the truncated version. MN7 was shown to have a very low amount of PG [20] and, to avoid a possible artifact in this particular strain, we re-examined the phospholipid composition, especially the amount of PG, in all the strains previously used to characterize CGI-58. Surprisingly, the results were similar in the wild-type strain, BL21(DE3), and in another phospholipid synthesis mutant, SM2-1 [Fig 4A]. In both strains there was no visual difference in the clones expressing mouse CGI-58 compared to the control; there was a lower amount of PG when the full-length version of *Arabidopsis* CGI-58 was expressed in BL21(DE3); and, again, significantly less PG in both strains when the truncated version was used [Fig 4A]. We hypothesized that the truncated version has a more dramatic effect because of the removal of the putative N-terminal peptide. Since the effects of recombinant plant CGI-58 expression appeared more dramatic in the SM2-1 strain, we decided to quantify the phospholipid content in this particular strain by LC/MS/MS. Although the

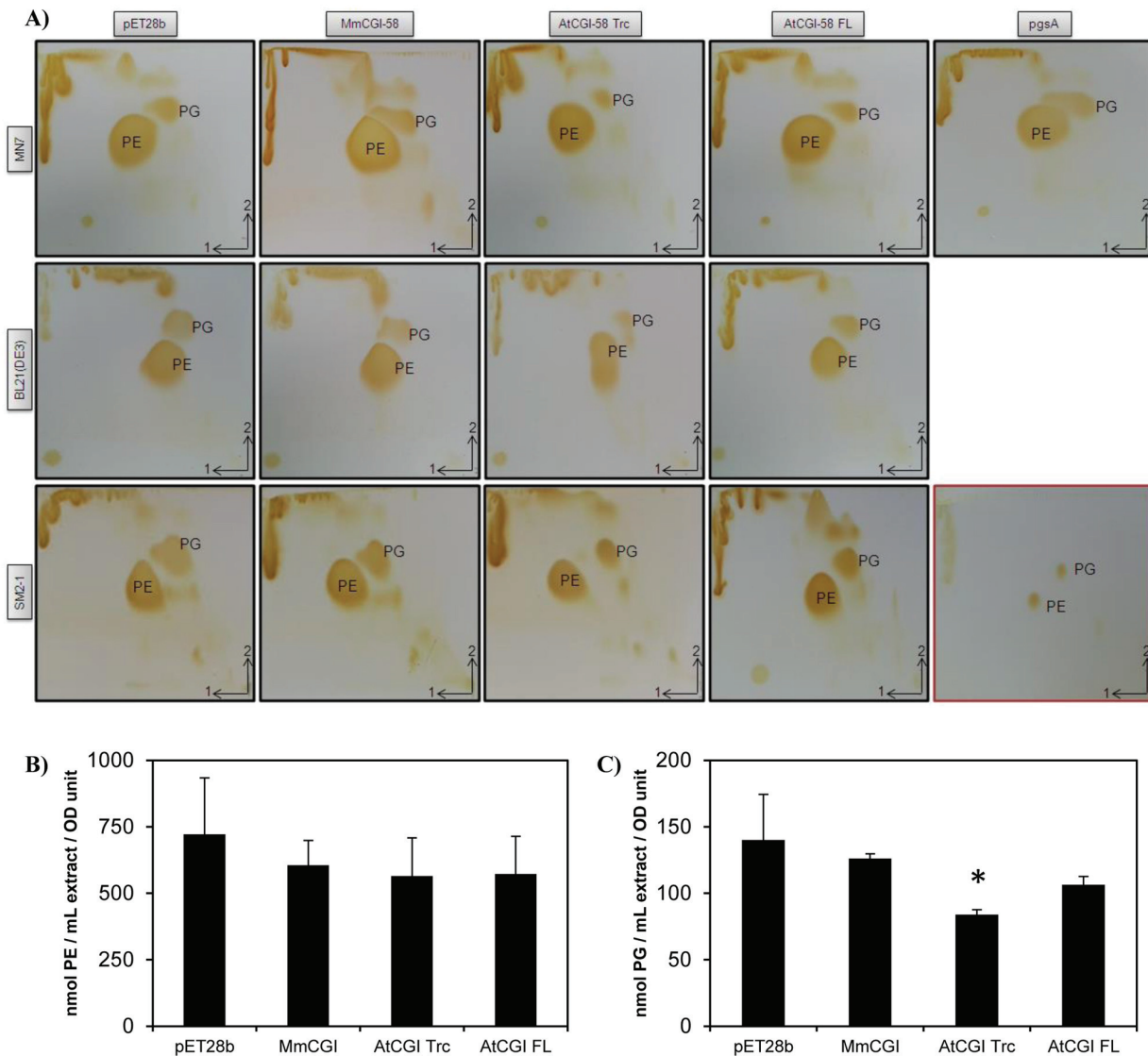


Fig 4. Analysis of phospholipids extracted from strains transformed with different versions of CGI-58. Strain MN7 deficient in PG synthesis [20], wt strain BL21(DE3) and strain SM2-1 deficient in PA synthesis [21] were all transformed with either the void plasmid, the CGI-58 from mouse, or the full-length or truncated version from plant CGI-58. *pgsA* was also used as a positive control to restore PG synthesis in MN7. MN7 and SM2-1 strains had been previously transformed with pYAT7. A) TLC analysis of total lipids extracted after a 4 h-induction of transformants by 1 mM IPTG, then separated by 2-D TLC with, first, chloroform/methanol/water (65:25:4, v/v/v), and then with chloroform/methanol/acetic acid (65:25:10, v/v/v). After drying the plates, the lipids were visualized by exposure to diiodine vapor. TLC with authentic PE and PG standards is shown in the bottom right-hand corner (red frame). Each experiment was repeated at least thrice. B) Measurement of PE content of SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted as above and analyzed. The quantities of PE were calculated based on a 36:2 PE standard curve and normalized with the OD_{600nm} values of the liquid cultures after a 4 h-induction by IPTG. Values ± SD are the mean of three independent clones. C) PG content in SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted as above and analyzed. The quantities of PG were calculated based on a 28:0 PG standard curve and normalized with the OD values as above. Values ± SD are the mean of three independent clones. * $P < 0.05$, (vs pET28b).

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g004

content of PE was not significantly different between all the clones tested [Fig 4B], the content of PG was reduced by 40% in clones expressing the truncated version of AtCGI-58, compared to the control [Fig 4C], confirming the results obtained by TLC analysis [Fig 4A].

There could be several reasons for the decrease in PG content: either PG or the precursors of PG synthesis [48], such as CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate, are used as a substrate

by plant CGI-58 to form another undetected lipid or, alternatively, CGI-58 may have a regulatory role in phospholipid synthesis. To test the hypothesis that PG could be a substrate for plant CGI-58, we synthesized labeled PG, from [^{14}C]-PC, using the phospholipase D-catalyzed transphosphatidyl transfer reaction of [^{14}C]-PC and glycerol. However, under the conditions used, neither the incubation of crude extract from the BL21(DE3) strain expressing plant CGI-58 nor the incubation of purified truncated protein in the presence of [^{14}C]-PG led to PG hydrolysis (data not shown), suggesting that either an acceptor of the PG moiety was missing in the enzymatic test or that PG is not a real substrate of recombinant plant CGI-58. The observation that CGI-58 may have a role in determining PG content or in homeostasis has already been described in the literature concerning mouse CGI-58 [49]. When CGI-58 expression was inhibited in adult mice by antisense oligonucleotides, there was a 10-fold increase in their hepatic PG level. Since mouse CGI-58 lacks the putative catalytic seryl residue, we could hypothesize that the effect of CGI-58 on the PG level may not be directly linked to its hydrolytic abilities, but rather to a signaling function. The fact that the amount of PG is affected by the expression of CGI-58 has already been observed *in planta* as well. An analysis of lipid profiles in plants mutated for CGI-58 showed that PG levels increased compared to the wild-type, whereas the amount of other major plant phospholipids (PC, PE, phosphatidylinositol and phosphatidylserine) was unchanged [4]. It is always possible that mammalian CGI-58s are not functional in *E. coli*, compared to eukaryotic expression systems and, hence, no effect is detected in this prokaryotic system. It would be interesting to measure all the enzymatic activities involved in phospholipid metabolism in *E. coli* in order to detect any changes due to CGI-58 expression and to restrict the metabolic route affected by its expression.

Using a PG phenotype to test for the importance of catalytic residues

Interestingly, the nature of the artefactual LPAAT activity of mouse CGI-58 was proven when the activity of the wild-type protein was discovered to be equivalent to that of recombinant CGI-58 with mutations in putative catalytic residues [18]. In order to prove that a catalytic activity, rather than a putative regulatory bias of plant CGI-58, was involved in the decrease of PG in *E. coli*, we decided to analyze the effect of a mutation of the seryl residue at position 199, using the difference in PG levels in transformants to screen other putative catalytic residues of recombinant plant CGI-58 protein. The seryl residue at position 199 is replaced in mammals by an asparaginyl and this residue is thought to be involved in the catalytic reaction [12,50]. In addition, histidyl 379 and aspartyl 384 have been identified as belonging to the HX₄D motif, which is indispensable for glycerolipid acyltransferase catalysis [51], and a particular 3-D modeling of murine CGI-58 has placed these 3 amino acids in close proximity to one another [12,50]. In order to verify the importance of the residues in the catalytic reaction, we designed primers to change these three residues by site-directed mutagenesis in plant CGI-58 and, hence, we created S199N, D384A and H379A versions of the truncated plant CGI-58. Mutated versions of plant CGI-58 were then expressed with the pYAT7 plasmids in MN7, SM2-1 and BL21(DE3) strains. Lipids were again extracted and separated by 2D-TLC for the MN7 and BL21(DE3) strains [Fig 5A]. Mutations S199N and H379A led to a visual increase of the PG level in both strains, demonstrating that S199 and H379 residues are involved in the decrease of PG seen in strains transformed with the wild-type construct. The amount of PG in mutant D384 is quite similar to that found in the corresponding wild-types, suggesting that this residue is not involved in the catalytic reaction. Consequently, we decided to quantify the amount of phospholipids, by LC/MS/MS, in SM2-1 transformants where we had previously observed the more dramatic effects. Compared to the wild-type version of the truncated plant protein, no statistical difference in PE content could be observed among the different mutations [Fig 5B].

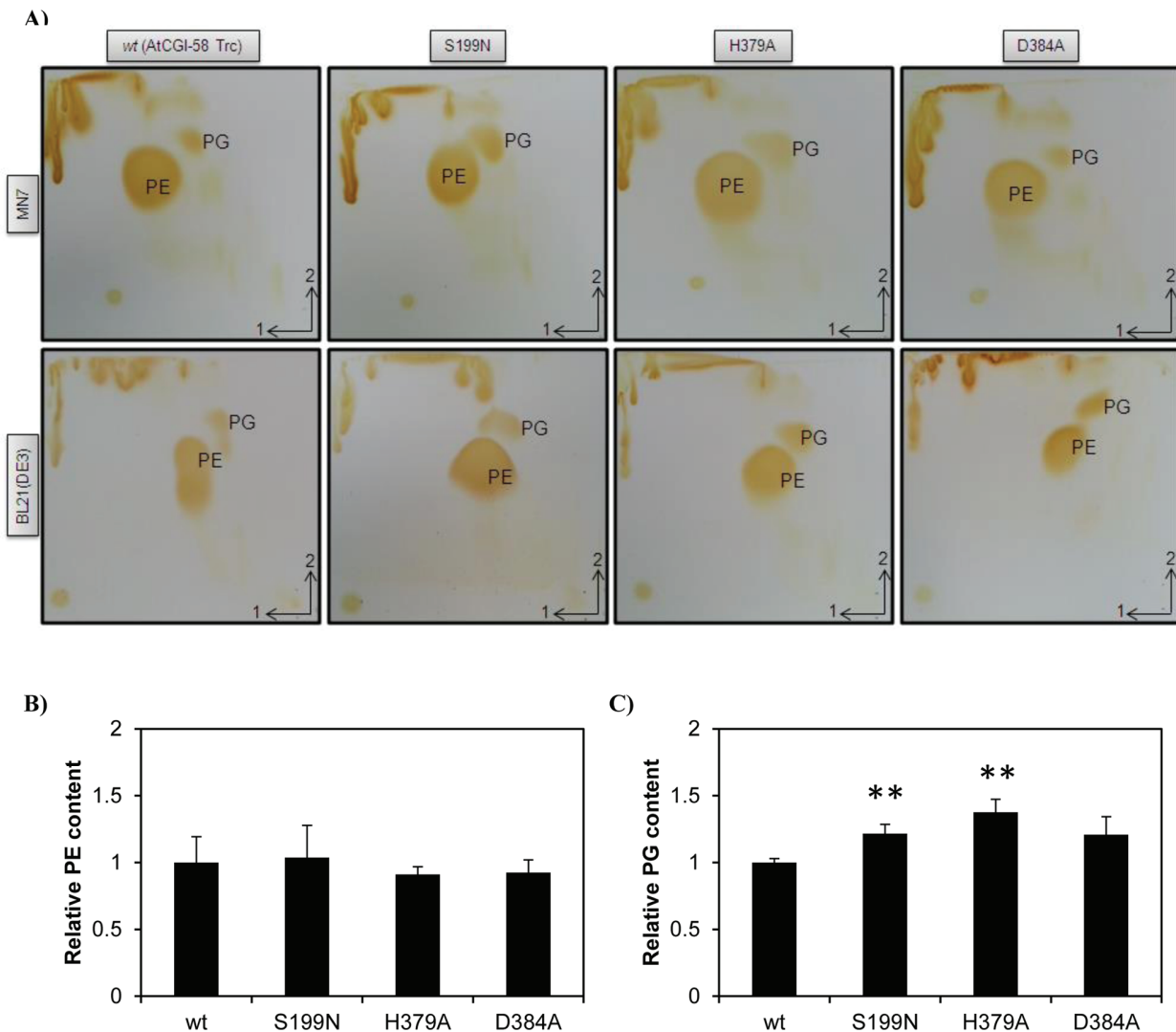


Fig 5. Analysis of phospholipids extracted from strains transformed with mutated versions of plant CGI-58. A) TLC analysis of total lipids extracted from strains MN7 and BL21(DE3). Lipids were extracted and separated as described in Fig 4. Experiments were carried out at the same time and under the same conditions and, for comparison, TLC pictures of wild-type AtCGI-58 Trc were duplicated from Fig 4. Each experiment was repeated at least twice. B) Comparison of the PE content of SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted and analyzed. The quantities of PE were calculated based on a 36:2 PE standard curve and normalized to the PE content of the wild-type (AtCGI-58 Trc). Values \pm SD are the mean of three independent clones. C) Comparison of the PG content of SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted and analyzed. The quantities of PG were calculated based on a 28:0 PG standard curve and normalized to the PG content of the wild-type (AtCGI-58 Trc). Values \pm SD are the mean of three independent clones. ** $P < 0.01$, (vs wt).

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g005

However, the PG content was significantly increased by 22 and 38% when the S199N and H379A versions of the protein were expressed respectively. The amount of PG was not statistically different from that of the wild-type when the D384A version was expressed. This D384 residue is not completely conserved among plant CGI-58s [S1 Fig] and it is sometimes replaced by Glutamyl, an alternate acidic residue, in *Theobroma cacao* and *Solanum lycopersicum*. It is still possible that another residue, such as D302 or D351 that is absolutely conserved in all plant CGI-58s [S1 Fig], could be the third member of the catalytic triad. We should point out that D351 has been identified [50] as the proposed catalytic residue in a 3D-modeling of

murine CGI-58. Moreover, another 3-D modeling of murine CGI-58 has placed the homolog of the D384 residue on the exterior surface of the protein rather than in the internal pocket [18]. As previously suspected, S199 is involved in the catalytic reaction. It is perhaps obvious that mammalian CGI-58 harboring an asparaginyl residue at the same position as the seryl residue plays no role in the decrease of PG, as shown in Fig 4, suggesting divergent roles for plant and mammalian CGI-58. Measuring the PG content could now be used as a screening method to establish which amino acid is important for the catalytic reactions involving plant CGI-58.

Conclusion

Although their role in lipid metabolism is demonstrated again here, plant and mammalian CGI-58 seem to have different catalytic roles, at least in regards to their involvement in the decrease of PG levels in *E. coli*. The catalytic activity of plant CGI-58 is still to be elucidated although we have shown for the first time that the seryl residue at position 199 and the histidyl residue at position 379 are implicated in recombinant plant CGI-58 activity. There are also several lines of evidence indicating that its activity is closely related to PG metabolism. *In planta*, the amount of PG has been shown to increase if CGI-58 is mutated, and we show in this paper that the quantity of PG decreases in bacteria when the protein is overexpressed. Since PG is directly linked with cardiolipin synthesis, some alternative roles of plant CGI-58, involving either PG precursors or PG sequels, are currently being investigated.

Supporting Information

S1 Fig. Alignment of plant CGI-58s. Sequences were retrieved from NCBI with the protein BLAST software, using *AtCGI-58* as bait, from Mosses through to Eudicot proteins. Alignment was performed with BioEdit software and the shading threshold was set to 75% identity. *Arabidopsis thaliana* At4g24160 was retrieved from a sequenced RAFL19-16-I19 clone and the *Physcomitrella patens* sequence was reconstructed from a sequencing of ESTs BY990945.1 and BJ940330.1. All the aforementioned clones were obtained from the Riken Institute [22,23]. Accession numbers are as following: *Camelina sativa* XP_010439078.1, *Brassica rapa* XP_009137743.1, *Populus trichocarpa* XP_002307698.2, *Theobroma cacao* XP_007017700.1, *Nelumbo nucifera* XP_010271460.1, *Eucalyptus grandis* XP_010061022.1, *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* XP_009418733.1, *Sesamum indicum* XP_011083599.1, *Solanum lycopersicum* XP_004243145.1, *Nicotiana glauca* XP_009794253.1, *Citrus sinensis* XP_006473603.1, *Ricinus communis* XP_002510485.1, *Phoenix dactylifera* XP_008813831.1, *Medicago truncatula* XP_003603733.1, *Glycine max* XP_006577977.1, *Fragaria vesca* subsp. *vesca* XP_004291822.1, *Malus domestica* XP_008347352.1, *Prunus persica* XP_007222711.1, *Picea glauca* BT117776.1, *Cucumis sativus* XP_004152662.1, *Amborella trichopoda* XP_006854859.1, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* XP_010670751.1, *Zea mays* ACF79200.1, *Oryza sativa Japonica Group* NP_001063697.2, *Brachypodium distachyon* XP_003578450.1, *Sorghum bicolor* XP_002460538.1. Positions of mutated residues S199, H379, and D384 of *Arabidopsis thaliana* CGI-58 are indicated by arrows.

(TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Sébastien Guiral for his advice on plasmid drawing and microbiology techniques, and Antoine Escudier for his technical help. The authors thank Baptiste Fourmaux (Functional Lipidomic Platform, IMBL-INSA Lyon, Villeurbanne, France) for the phospholipid analysis. We are grateful to Lígia Martins for providing the *CotA* clone. Prof. Dawn

Brasaemle is gratefully acknowledged for providing the *MmCGI-58* clone and for her advice on mouse CGI-58 purification. The English revision by Valerie James and Julie Carter is also appreciated. Abdallah Khatib was supported by a grant from LASER (Lebanese Association for Scientific Research).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AK AA AN. Performed the experiments: AK YA AB AN. Analyzed the data: AK YA AB AA AN. Wrote the paper: AK AN.

References

1. Lefevre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, et al. (2001) Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet* 69: 1002–1012. PMID: [11590543](#)
2. Xie M, Roy R (2015) The Causative Gene in Chanarin Dorfman Syndrome Regulates Lipid Droplet Homeostasis in *C. elegans*. *PLoS Genet* 11: e1005284. doi: [10.1371/journal.pgen.1005284](#) PMID: [26083785](#)
3. Serr J, Suh Y, Lee K (2011) Cloning of comparative gene identification-58 gene in avian species and investigation of its developmental and nutritional regulation in chicken adipose tissue. *J Anim Sci* 89: 3490–3500. doi: [10.2527/jas.2011-3897](#) PMID: [21642491](#)
4. James CN, Horn PJ, Case CR, Gidda SK, Zhang D, et al. (2010) Disruption of the Arabidopsis CGI-58 homologue produces Chanarin-Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17833–17838. doi: [10.1073/pnas.0911359107](#) PMID: [20876112](#)
5. Ghosh AK, Ramakrishnan G, Rajasekharan R (2008) YLR099C (ICT1) encodes a soluble Acyl-CoA-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic solvent stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283: 9768–9775. doi: [10.1074/jbc.M708418200](#) PMID: [18252723](#)
6. Entian KD, Schuster T, Hegemann JH, Becher D, Feldmann H, et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* 262: 683–702. PMID: [10628851](#)
7. Matsui K, Hirayama T, Kuroda K, Shirahige K, Ashikari T, et al. (2006) Screening for candidate genes involved in tolerance to organic solvents in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 75–79. PMID: [16493551](#)
8. Park S, Gidda SK, James CN, Horn PJ, Khoo N, et al. (2013) The alpha/beta hydrolase CGI-58 and peroxisomal transport protein PXA1 coregulate lipid homeostasis and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 1726–1739. doi: [10.1105/tpc.113.111898](#) PMID: [23667126](#)
9. Zolman BK, Silva ID, Bartel B (2001) The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol* 127: 1266–1278. PMID: [11706205](#)
10. Park S, Keereetaweep J, James CN, Gidda SK, Chapman KD, et al. (2014) CGI-58, a key regulator of lipid homeostasis and signaling in plants, also regulates polyamine metabolism. *Plant Signal Behav* 9: e27723. PMID: [24492485](#)
11. Bayer A, Ma X, Stockigt J (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis—functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg Med Chem* 12: 2787–2795. PMID: [15110860](#)
12. Ghosh AK, Chauhan N, Rajakumari S, Daum G, Rajasekharan R (2009) At4g24160, a soluble acyl-coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Plant Physiol* 151: 869–881. doi: [10.1104/pp.109.144261](#) PMID: [19700561](#)
13. Schweiger M, Lass A, Zimmermann R, Eichmann TO, Zechner R (2009) Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E289–296. doi: [10.1152/ajpendo.00099.2009](#) PMID: [19401457](#)
14. Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T (2004) CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* 279: 30490–30497. PMID: [15136565](#)
15. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, et al. (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3: 309–319. PMID: [16679289](#)

16. Zierler KA, Jaeger D, Pollak NM, Eder S, Rechberger GN, et al. (2013) Functional cardiac lipolysis in mice critically depends on comparative gene identification-58. *J Biol Chem* 288: 9892–9904. doi: [10.1074/jbc.M112.420620](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420620) PMID: [23413028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23413028/)
17. Montero-Moran G, Caviglia JM, McMahon D, Rothenberg A, Subramanian V, et al. (2010) CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *J Lipid Res* 51: 709–719. doi: [10.1194/jlr.M001917](https://doi.org/10.1194/jlr.M001917) PMID: [19801371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19801371/)
18. McMahon D, Dinh A, Kurz D, Shah D, Han GS, et al. (2014) Comparative gene identification 58/alpha beta hydrolase domain 5 lacks lysophosphatidic acid acyltransferase activity. *J Lipid Res* 55: 1750–1761. PMID: [24879803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24879803/)
19. Zhang J, Xu D, Nie J, Han R, Zhai Y, et al. (2014) Comparative gene identification-58 (CGI-58) promotes autophagy as a putative lysophosphatidylglycerol acyltransferase. *J Biol Chem* 289: 33044–33053. doi: [10.1074/jbc.M114.573857](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573857) PMID: [25315780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25315780/)
20. Nishijima M, Bulawa CE, Raetz CR (1981) Two interacting mutations causing temperature-sensitive phosphatidylglycerol synthesis in *Escherichia coli* membranes. *J Bacteriol* 145: 113–121. PMID: [7007311](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7007311/)
21. Coleman J (1990) Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *J Biol Chem* 265: 17215–17221. PMID: [2211622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2211622/)
22. Seki M, Carninci P, Nishiyama Y, Hayashizaki Y, Shinozaki K (1998) High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J* 15: 707–720. PMID: [9778851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9778851/)
23. Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Satou M, et al. (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296: 141–145. PMID: [11910074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11910074/)
24. Ben Ali Y, Carriere F, Abousalham A (2007) High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Expr Purif* 51: 162–169. PMID: [16949301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16949301/)
25. Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2035–2039. PMID: [6371808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6371808/)
26. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917. PMID: [13671378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13671378/)
27. Ames GF (1968) Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J Bacteriol* 95: 833–843. PMID: [4868364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4868364/)
28. Beneyton T, Coldren F, Baret JC, Griffiths AD, Taly V (2014) CotA laccase: high-throughput manipulation and analysis of recombinant enzyme libraries expressed in *E. coli* using droplet-based microfluidics. *Analyst* 139: 3314–3323. doi: [10.1039/c4an00228h](https://doi.org/10.1039/c4an00228h) PMID: [24733162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24733162/)
29. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2: 953–971. PMID: [17446895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17446895/)
30. West J, Tompkins CK, Balantac N, Nudelman E, Meengs B, et al. (1997) Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA Cell Biol* 16: 691–701. PMID: [9212163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9212163/)
31. Brown AP, Carnaby S, Brough C, Brazier M, Slabas AR (2002) *Limnanthes douglasii* lysophosphatidic acid acyltransferases: immunological quantification, acyl selectivity and functional replacement of the *Escherichia coli* plsC gene. *Biochem J* 364: 795–805. PMID: [12049644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12049644/)
32. Cullinane M, Baysse C, Morrissey JP, O’Gara F (2005) Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151: 3071–3080. PMID: [16151217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16151217/)
33. Aygun-Sunar S, Bilaloglu R, Goldfine H, Daldal F (2007) *Rhodobacter capsulatus* OlsA is a bifunctional enzyme active in both ornithine lipid and phosphatidic acid biosynthesis. *J Bacteriol* 189: 8564–8574. PMID: [17921310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17921310/)
34. Morand LZ, Patil S, Quasney M, German JB (1998) Alteration of the fatty acid substrate specificity of lysophosphatidate acyltransferase by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 79–84. PMID: [9514885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9514885/)
35. Sutterlin HA, Zhang S, Silhavy TJ (2014) Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196: 3214–3220. doi: [10.1128/JB.01876-14](https://doi.org/10.1128/JB.01876-14) PMID: [24957626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24957626/)
36. Coleman J (1992) Characterization of the *Escherichia coli* gene for 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsC). *Mol Gen Genet* 232: 295–303. PMID: [1557036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1557036/)
37. Nantel G, Baraff G, Proulx P (1978) The lipase activity of a partially purified lipolytic enzyme of *Escherichia coli*. *Can J Biochem* 56: 324–328. PMID: [352486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/352486/)

38. Raetz CR (1978) Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 42: 614–659. PMID: [362151](#)
39. Willis LM, Whitfield C (2013) KpsC and KpsS are retaining 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferases involved in synthesis of bacterial capsules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20753–20758. doi: [10.1073/pnas.1312637110](#) PMID: [24302764](#)
40. France RM, Grossman SH (1996) Denaturation and urea gradient gel electrophoresis of arginine kinase: evidence for a collapsed-state conformation. *Arch Biochem Biophys* 326: 93–99. PMID: [8579378](#)
41. Beattie BK, Merrill AR (1996) In vitro enzyme activation and folded stability of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its C-terminal peptide. *Biochemistry* 35: 9042–9051. PMID: [8703907](#)
42. Ma YZ, Tsou CL (1991) Comparison of the activity and conformation changes of lactate dehydrogenase H4 during denaturation by guanidinium chloride. *Biochem J* 277 (Pt 1): 207–211. PMID: [1854334](#)
43. Pan JC, Yu Z, Su XY, Sun YQ, Rao XM, et al. (2004) Unassisted refolding of urea-denatured arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: evidence for two equilibrium intermediates in the refolding pathway. *Protein Sci* 13: 1892–1901. PMID: [15215531](#)
44. Dryden SC, Dowhan W (1996) Isolation and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* gene (*pgsA*) encoding phosphatidylglycerophosphate synthase. *J Bacteriol* 178: 1030–1038. PMID: [8576035](#)
45. Homma H, Nojima S (1982) Synthesis of various phospholipids from 2-acyl lysophospholipids by *Escherichia coli* extract. *J Biochem* 91: 1103–1110. PMID: [7047508](#)
46. Willis LM, Stupak J, Richards MR, Lowary TL, Li J, et al. (2013) Conserved glycolipid termini in capsular polysaccharides synthesized by ATP-binding cassette transporter-dependent pathways in Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7868–7873. doi: [10.1073/pnas.1222317110](#) PMID: [23610430](#)
47. Nishijima M, Raetz CR (1979) Membrane lipid biogenesis in *Escherichia coli*: identification of genetic loci for phosphatidylglycerophosphate synthetase and construction of mutants lacking phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 254: 7837–7844. PMID: [381294](#)
48. Lu YH, Guan Z, Zhao J, Raetz CR (2011) Three phosphatidylglycerol-phosphate phosphatases in the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 286: 5506–5518. doi: [10.1074/jbc.M110.199265](#) PMID: [21148555](#)
49. Brown JM, Betters JL, Lord C, Ma Y, Han X, et al. (2010) CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance. *J Lipid Res* 51: 3306–3315. doi: [10.1194/jlr.M010256](#) PMID: [20802159](#)
50. Oberer M, Boeszoermyeni A, Nagy HM, Zechner R (2011) Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58. *Curr Opin Lipidol* 22: 149–158. doi: [10.1097/MOL.0b013e328346230e](#) PMID: [21494142](#)
51. Heath RJ, Rock CO (1998) A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol* 180: 1425–1430. PMID: [9515909](#)

Caractérisation structurale et fonctionnelle des phospholipases D

Les phospholipases D (PLD, EC 3.1.4.4) sont des enzymes retrouvées aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Les PLD catalysent l'hydrolyse des glycérophospholipides au niveau distal de la liaison phosphodiester pour former notamment de l'acide phosphatidique, un important messenger cellulaire impliqué dans de nombreuses voies, telles que la prolifération cellulaire, la formation et le trafic vésiculaire, mais aussi la transcription et la survie cellulaire. Les PLD appartiennent à une superfamille de protéines (superfamille des PLD) qui ont en commun un site catalytique HXKK₄D, X étant un résidu quelconque et contenant donc les résidus H (Histidyl), K (Lysyl) et D (Aspartyl). Ce site est nommé séquence consensus "HKD" et est dupliqué dans la plupart des membres de la superfamille des PLD.

L'étude des PLD de plante est le moyen le plus sûr d'étudier cette famille d'enzyme car ce sont les seules PLD eucaryotiques purifiées à homogénéité et en grande quantité à ce jour.

Ces travaux proposent une caractérisation fonctionnelle des résidus conservés au sein des PLD végétales menant à une caractérisation structurale avec la cristallisation de cette protéine. Dans un second temps l'activité de l'enzyme est modulée avec l'étude du domaine minimum, de la maturation post-traductionnelle de l'enzyme et la recherche de nouveaux inhibiteurs. Enfin, nous proposons le clonage d'une nouvelle PLD et la mise au point d'un système de détection *in vivo* de l'activité PLD. Ces recherches s'attachent à caractériser au niveau structural et fonctionnelle les PLD qui sont aujourd'hui de véritables cibles thérapeutiques.

Mots-clés : Phospholipase D, catalyse, enzyme, motif HKD, structure-fonction

Structural and functional characterization of phospholipases D

Phospholipases D (PLD, EC 3.1.4.4) are enzymes found in prokaryotes as well as in eukaryotes. PLD catalyzes the hydrolysis of the distal phosphoester bound of glycerophospholipids thus forming phosphatidic acid, an important cell signaling messenger implicated in numerous pathways such as cell proliferation, vesicular formation and trafficking but also transcription and cell survival.

PLDs belong to a superfamily of proteins which share a common catalytic site called "HKD" for HXKK₄D, X is a random residu, containing H (Histidyl), K (lysyl) and D (aspartyl) residues. This consensus sequence is duplicated in most of the PLD superfamily members.

The study of plant PLD is the best way to understand this family of proteins as they are the only eukaryotic PLDs to be purified to homogeneity so far.

This work provides a functional characterization of the most conserved residues in plant PLDs leading to a structural characterization with the crystallization of this enzyme. A second part of this work proposes the modulation of the enzyme hydrolysis activity by studying the minimal domain necessary for the activity and post-translational maturation undergone by plant PLDs. Also, we look for a new specific inhibitory molecule. Finally, we propose the cloning of a new plant PLD and the development of a new tool to detect *in vivo* PLD activity. The aim of this work is to structurally and functionally characterize PLDs that are growing therapeutic targets.

Keywords : Phospholipase D, catalysis, enzyme, HKD motifs, structure-function