



HAL
open science

Implication de l'acide phosphatidique dans le trafic membranaire : rôle et régulation de la phospholipase D au cours de la phagocytose et de l'exocytose régulée

Emeline Tanguy

► To cite this version:

Emeline Tanguy. Implication de l'acide phosphatidique dans le trafic membranaire : rôle et régulation de la phospholipase D au cours de la phagocytose et de l'exocytose régulée. Biologie moléculaire. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ112 . tel-02919857

HAL Id: tel-02919857

<https://theses.hal.science/tel-02919857>

Submitted on 24 Aug 2020

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

INCI – CNRS UPR 3212

THÈSE

Présentée par

Émeline TANGUY

Soutenue publiquement le : **18 juin 2019**

Pour l'obtention du grade de :
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Implication de l'acide phosphatidique dans le trafic membranaire : rôle et régulation de la phospholipase D au cours de la phagocytose et de l'exocytose régulée

THÈSE dirigée par :

M. VITALE Nicolas

Directeur de recherche Inserm, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme NIEDERGANG Florence

M. RECORD Michel

Directrice de recherche CNRS, Université Paris Descartes

Directeur de recherche Inserm, Université Toulouse III

EXAMINATEUR :

Mme FRIANT Sylvie

Directrice de recherche CNRS, Université de Strasbourg

Remerciements

J'ai effectué ma thèse à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), au sein de l'équipe « Trafic membranaire intracellulaire dans les systèmes nerveux & neuroendocrine », dirigée par Nicolas VITALE et Stéphane GASMAN.

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse, **Sylvie FRIANT**, **Florence NIEDERGANG**, et **Michel RECORD**, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je témoigne ensuite ma gratitude envers les responsables de **l'École de l'Inserm Liliane Bettencourt**, qui m'ont donné l'opportunité de suivre ce cursus Pharmacie-Sciences depuis 2013. J'adresse également mes sincères remerciements à **Odile SERGENT**, enseignante-chercheuse à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Rennes I, qui m'a fortement encouragée à m'engager dans ce double cursus et m'a soutenue durant toutes les étapes de mon parcours. Mes remerciements vont également à **Pierre VEINANTE**, qui m'a accueillie au sein du Master 2 de Neurosciences à Strasbourg et m'a ainsi permis de suivre un excellent cursus scientifique dans cette magnifique ville à l'autre bout de la France.

Ces 4 années de doctorat ont été particulièrement riches, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je tiens à remercier ici les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail :

Je remercie tout d'abord **Marie-France BADER** de m'avoir accueillie dans son laboratoire, ainsi que d'avoir accordé sa confiance aux étudiants de l'association Doctoneuro, lors de l'organisation d'événements à l'INCI. J'ai également apprécié ses remarques toujours pertinentes lors de nos réunions d'équipe.

J'adresse des remerciements particuliers à mon directeur de thèse **Nicolas VITALE**, dont j'ai pu apprécier toutes les qualités scientifiques et humaines dès la fin de mon Master 2. Merci de m'avoir encadrée en étant disponible à tout moment, patient et compréhensif. Je tiens également à le remercier pour sa confiance, et notamment pour la liberté qu'il m'a accordée de participer à diverses activités pédagogiques en parallèle de mon travail de recherche. Malgré mes périodes de doutes, il m'a toujours encouragée à valoriser mon travail et m'a fait profiter de nombreuses collaborations en ce sens. Je souhaite lui témoigner ma gratitude pour l'indulgence et le professionnalisme dont il a fait preuve durant ces 4 années.

Un très grand merci également à **Nancy GRANT**, qui m'a formée durant ma première année de thèse aux expériences sur les macrophages. Je lui suis très reconnaissante du temps qu'elle a bien voulu me consacrer et de l'expérience qu'elle m'a apportée, avant de profiter d'une retraite bien méritée. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions techniques, de m'avoir appris à ne pas brûler les étapes (« *baby steps!* »), et d'avoir été d'un grand soutien quand j'en avais « *too much on my plate* » ... Je garderai un excellent souvenir de nos séances de travail, ainsi que de nos discussions.

Je souhaite également remercier les autres membres de l'équipe « VITALE-GASMAN » :

Sylvette CHASSEROT-GOLAZ, pour la formation initiale (et continue !) à la microscopie confocale, ainsi qu'à la préparation des feuillets de membrane et l'analyse des images. J'ai apprécié sa disponibilité et son regard critique, ainsi que nos discussions scientifiques.

Stéphane ORY, pour avoir répondu patiemment à toutes mes questions sur l'imagerie et m'avoir initiée aux analyses sur Icy. Je le remercie pour tous les protocoles de quantification qu'il a conçus, ainsi que son aide précieuse pour régler les divers soucis informatiques !... Nos échanges techniques et scientifiques m'ont beaucoup apporté.

Tam THAHOUPLY, ma voisine de bureau, pour m'avoir formée au clonage et surtout pour les cultures de cellules chromaffines bovines, qui n'ont pas été de tout repos ! Merci aussi d'avoir amené un petit coin de nature dans notre bureau !

Stéphane GASMAN, pour ses remarques constructives, mais également sa bonne humeur, qui apporte une ambiance de travail conviviale. Merci pour ces notes d'humour qui ont ponctué nos « sorties » à l'abattoir et les déjeuners à la cafétéria !

Anne-Marie HAEBERLE, pour sa grande générosité, ainsi que son expertise en imagerie, en chant et en pâtisserie ! Merci particulièrement pour sa participation au pot de thèse.

Valérie CALCO, pour s'être occupée de la culture de cellules PC12 et m'en avoir transmis les bases avant son départ. Son assistance technique a été très utile durant mon début de thèse.

Claudine BOISSIER, pour sa serviabilité, ainsi que la gestion des stocks et commandes.

Audrey GROH, ma collègue de paillasse d'en face, pour nos joyeuses discussions (et chansons !) durant les manips. Un grand merci également pour la relecture du manuscrit !

Les « 3 Marion » de l'équipe : **Marion RAME**, avec qui j'ai embarqué à l'INCI et partagé de très bons moments ; **Marion GABEL**, qui m'a transmis ses connaissances et pris le temps de répondre à mes questions de « jeune doctorante en détresse » avant de partir vers de nouveaux horizons ; et **Marion MILLET**, qui a initié les fameuses pauses « café-soleil » qui permettaient de décrocher (un peu) des manips. Merci pour votre amitié et les excellents souvenirs que j'en garderai, de nos conversations du midi aux soirées ensemble (et bonne chance pour la suite !).

Et enfin, les autres étudiants de l'équipe, anciens et nouveaux : **Qili** pour sa sympathie et les services rendus ; **Cathy** pour son aide dans la culture de PC12 ; **Charlotte** pour sa générosité ; **Sophie** pour les discussions sur le double cursus Santé-Sciences ; **Laura** et **Margherita** à qui je souhaite bon courage pour leur thèse.

Il me tient également à cœur de remercier certaines personnes extérieures à l'équipe qui, grâce à leurs diverses compétences et expertise, m'ont permis de mener à bien ma thèse :

Cathy ROYER et **Valérie DEMAIS**, pour le traitement des échantillons, les discussions en séances de microscopie électronique (ou durant les « pauses goûters » au milieu), leur bonne humeur communicative et leur disponibilité ; **Jean-Daniel FAUNY**, pour la formation au microscope confocal à *spinning disk* et son aide précieuse pour les innombrables soucis

techniques ; **Denis WAGNER**, pour son assistance indispensable en informatique ; **Christophe et Philippe** pour la maintenance technique du bâtiment ; **Marie-Pierre** pour son aide à la toute fin du parcours ; **Cédric, Sandra et Yaëlle** pour leur efficacité ; **Fatima et Sonia** pour la vaisselle et leur « bonjour » sympathique ; **Paulina GONZALES**, ancienne post-doctorante en chimie avec qui j'ai eu la chance de collaborer, pour sa gentillesse et les nombreuses discussions enrichissantes ; et enfin **le personnel de l'abattoir de Haguenau**, que j'ai côtoyé en fin de thèse, pour leur amabilité et leur professionnalisme.

En parallèle de mes travaux de recherche, la pédagogie a fait partie intégrante de ma thèse. Je remercie notamment **Petra TOTH** de m'avoir fait connaître la joie de l'enseignement. Je lui suis infiniment reconnaissante de son appui lors de ma candidature en monitorat, puis en tant qu'ATER. J'ai beaucoup apprécié ses méthodes pédagogiques, son dynamisme et son enthousiasme communicatif. Merci également aux étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer, notamment **Claire** durant son stage de Master 2, ainsi que les étudiants de Licence. Ces expériences enrichissantes ont confirmé mon désir d'allier l'enseignement à la recherche.

Au-delà d'avoir été un parcours scientifique, mon doctorat a également été une vraie expérience de vie durant laquelle j'ai beaucoup appris, dans différents domaines. Je souhaite ainsi remercier les personnes qui m'ont permis de m'épanouir durant ces 4 ans :

Les membres du bureau de l'association **Doctoneuro** que j'ai côtoyés : **Baptiste, Perrine, Thibaut, Ludo, Maxime, Léa, Clarisse, David...** Je garderai de très bons souvenirs des réunions de bureau, et des différentes actions mises en œuvre ! Longue vie à cette association !

Les membres du groupe de musique de l'INCI, **les Mygales Détendues**, qui m'ont permis d'exercer ma passion pour le chant, ma soupape de décompression hebdomadaire, et ont facilité mon intégration dans l'institut. Merci à **Pierre, Sylvain, Ludo, Baptiste, Pierrick, Alex, Michael, Arnaud, Tando, Marine et Fanny**, pour tous les bons moments ensemble durant les répétitions et les concerts ! J'en garderai d'excellents souvenirs.

Mes amies de toujours, **Mathilde et Cathy**, pour leurs encouragements, surtout dans la dernière ligne droite, les longues discussions Skype, les weekends ensemble, et leur vision de non-scientifique très utile pour me faire relativiser.

Ma famille pour leur soutien inconditionnel : Maman et Jean-Mi, qui n'ont jamais douté de ma réussite et m'ont permis de réaliser ces nombreuses années d'étude dans les meilleures conditions ; Samuel et Léna, pour les moments de complicité fraternels ; mes grands-parents et ma Tata, pour le réconfort les weekends où je revenais au bercail. Une pensée particulière pour mon père, qui a toujours été fier de sa fille et qui le serait sûrement encore aujourd'hui...

Et bien sûr **Mathieu**, pour avoir supporté les heures de travail à la maison, son soutien sans faille dans les moments les plus difficiles, et son appui durant la rédaction de ce manuscrit.

« It always seems impossible... until it is done » (Nelson Mandela)

Liste des abréviations

Actine-F	Actine Filamenteuse
Actine-G	Actine Globulaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
ADR	Acyl-Dihydroxyacétone phosphate Réductase
AP	<i>Adaptor Protein</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
Arf	<i>ADP-Ribosylation Factor</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ARNO	<i>ARf Nucleotide-binding site Opener</i>
Arp2/3	<i>Actin Related Protein 2/3 complex</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAPTA	1,2,-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,-N',N', tetra-acetic acid
BAR	<i>Bin/Amphiphysin/Rvs</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCB	Cellule Chromaffine Bovine
CDP	Cytidine DiPhosphate
CDS	Cytidine diphosphate-Diacylglycérol Synthase
CGN	Réseau <i>cis</i> -golgien (<i>Cis-Golgi Network</i>)
CL	CardioLipine
CLS	Syndrome de Coffin-Lowry (<i>Coffin-Lowry Syndrom</i>)
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CR	Récepteur au complément (<i>Complement Receptor</i>)
C-ter	Carboxy-terminal
DAG	DiAcylGlycérol
DBH	Dopamine β -Hydroxylase
DGK	DiacylGlycérol Kinase
DHAP	DiHydroxyAcétone Phosphate
DHAP AT	DiHydroxyAcétone Phosphate AcylTransférase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
EDTA	Acide éthylène diamino-tétra-acétique
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	Récepteur à l'EGF (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EGTA	Acide Ethylène Glycol Tétracétique
FcR	Récepteur à la portion constante (Fc) des immunoglobulines
FIPI	5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopémide
fMLP	<i>N-formylMethionyl-Leucyl-Phenylalanine</i>
FMRP	<i>Fragile-X Mental Retardation Protein</i>

G3P	Glycérol-3-Phosphate
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor</i>
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	<i>Guanine nucleotide-Exchange Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GGA	<i>Golgi-localized, γ-adaptin ear containing, Arf-binding protein</i>
GPAT	Glycérol-3-Phosphate AcylTransfèrease
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
GST	Glutathion S-Transfèrease
GTP	Guanosine TriPhosphate
GTP γ S	Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
HA	HémAgglutinine
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
Ig	Immunoglobuline
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>
kDa	KiloDalton
KO	<i>Knock Out</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LN	Solution de Locke Normal
LPA	Acide lysophosphatidique (<i>LysoPhosphatidic Acid</i>)
LPAAT	<i>LysoPhosphatidic Acid AcylTransfèrease</i>
LPC	LysoPhosphatidylCholine
LPS	LipoPolySaccharide
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MSD	<i>Mean Square Displacement</i>
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NPY	NeuroPeptide Y
NSF	<i>N-ethylmaleimide Sensitive Factor</i>
N-ter	Amino-terminal
PA	Acide phosphatidique (<i>Phosphatidic Acid</i>)
PABD	Domaine de liaison au PA (<i>PA-Binding Domain</i>)
PAP	<i>Phosphatidic Acid Phosphatase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PC	PhosphatidylCholine
PDE4A1	<i>cAMP PhosphoDiEsterase-4A1</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PE	PhosphatidylEthanolamine
PFA	ParaFormAldéhyde

PG	PhosphatidylGlycérol
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI	PhosphatidylInositol
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PI3P	PhosphatidylInositol-3-Phosphate
PI(3,4,5)P ₃	PhosphatidylInositol-3,4,5-triphosphate
PI4P	PhosphatidylInositol-4-Phosphate
PI4P5K	PhosphatidylInositol-4-Phosphate 5-Kinase
PI(4,5)P ₂	PhosphatidylInositol-4,5-bisphosphate
PI5P	PhosphatidylInositol-5-Phosphate
PI5P4K	PhosphatidylInositol-5-Phosphate 4-Kinase
PIP	Phosphoinositides
PKC	Protéine Kinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PM	Poids Moléculaire
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PS	PhosphatidylSérine
PX	<i>Phox Homology</i>
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RE	Réticulum Endoplasmique
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
Rho	<i>Ras HOmology family protein</i>
RSK2	<i>Ribosomal S6 Kinase 2</i>
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
S6K	<i>ribosomal S6 Kinase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SM	SphingoMyéline
sn	<i>Stereospecific Numbering</i>
SNAP25	<i>SyNaptosomal-Associated Protein, 25 kDa</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor</i>
TG	Triglycérides
TGN	Réseau trans-golgien (<i>Trans-Golgi Network</i>)
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
VAMP	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein</i>

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Modèle initial de la mosaïque fluide, en vue isométrique (A) et en coupe transversale (B).....	5
Figure 2 : Hétérogénéité latérale d'une membrane biologique, en vue isométrique (A) et en coupe transversale (B).....	7
Figure 3 : Structure générale d'un glycérophospholipide.....	8
Figure 4 : Géométrie des glycérophospholipides et influence sur la courbure membranaire	10
Figure 5 : Hétérogénéité transversale des membranes	12
Figure 6 : Les différentes voies de transport vésiculaire au sein des cellules	14
Figure 7 : Représentation des étapes génériques du trafic vésiculaire entre deux compartiments cellulaires	16
Figure 8 : Les différents constituants du cytosquelette	17
Figure 9 : Organisation du cytosquelette d'actine.....	20
Figure 10 : Les étapes de la fusion membranaire selon le modèle de la tige de fusion	23
Figure 11 : Exemple de l'organisation structurale du complexe SNARE à la membrane plasmique au niveau de l'élément présynaptique	24
Figure 12 : Diversité de composition lipidique dans les membranes cellulaires.....	26
Figure 13 : Modèle de l'influence de la géométrie des phospholipides sur les étapes de la fusion membranaire	27
Figure 14 : Structure de l'acide phosphatidique (PA) et importance des chaînes d'acides gras ...	29
Figure 15 : Les différents modes d'action du PA dans la signalisation cellulaire.....	31
Figure 16 : Représentation de l'interaction entre la tête polaire du PA et la fonction amine primaire d'un résidu basique d'une protéine cible, selon le modèle <i>electrostatic-hydrogen bond switch</i>	32
Figure 17 : Le PA, un élément central dans le métabolisme lipidique	36
Figure 18 : Voies de biosynthèse du PA.....	38
Figure 19 : Structure des isoformes des PLD à séquence consensus HKD identifiées chez les mammifères	43
Figure 20 : Réactions enzymatiques catalysées par les différentes phospholipases.....	46
Figure 21 : Réactions enzymatiques catalysées par la PLD.....	47
Figure 22 : Mécanisme catalytique des PLD	49
Figure 23 : Structure chimique d'inhibiteurs de PLD dérivant de l'halopémidé.....	53
Figure 24 : Modèle illustrant les différences de localisation de la PLD1 selon le type cellulaire et son cyclage entre les compartiments membranaires	62
Figure 25 : Les voies d'activation des PLD1 et PLD2	64

Figure 26 : Cycle d'activation des petites protéines G	71
Figure 27 : Rôles des PLD dans la signalisation cellulaire et implications pathologiques	80
Figure 28 : Les différentes fonctions de la phagocytose.....	93
Figure 29 : Les principales voies d'endocytose dans la cellule	94
Figure 30 : Illustration de la formation du phagosome au cours de la phagocytose de billes de latex par un macrophage	99
Figure 31 : Les principales étapes de la phagocytose	99
Figure 32 : La familles des récepteurs aux IgG (FcγR)	102
Figure 33 : La sécrétion et les différentes étapes de l'exocytose régulée par le calcium	124
Figure 34 : Les glandes surrénales	127
Figure 35 : La PLD semble participer à la mise en place de câbles d'actine au niveau des sites d'exocytose	136
Figure 36 : L'activité PLD influence la mobilité des granules de sécrétion dans les cellules PC12	138
Figure 37 : L'inhibition de la PLD affecte l'endocytose compensatrice.....	141
Figure 38 : Modèle simplifié de l'implication de la PLD1 et des différentes formes de PA dans les différentes étapes de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines.....	142
Figure 39 : Méthode d'analyse des mouvements des granules de sécrétion	147
Figure 40 : Protocole général du test d'internalisation de la DBH	148
Figure 41 : Méthode de quantification de l'endocytose compensatrice grâce à la méthode de carte de distance euclidienne (EDM).....	150
Figure 42 : Préparation de feuillets de membrane plasmique.....	151
Tableau 1 : Les principaux groupements polaires des glycérophospholipides membranaires.....	9
Tableau 2 : Liste non exhaustive de protéines de mammifères interagissant avec le PA.....	33

Table des matières

Avant-propos	1
- Introduction générale - Trafic membranaire et remodelage lipidique, le rôle de la phospholipase D	4
I. Les membranes lipidiques	4
A. La structure des membranes cellulaires : rappels historiques	4
1. Des premières hypothèses au modèle de Singer et Nicolson	4
2. Du modèle initial vers la notion de « microdomaines lipidiques »	5
B. Composition lipidique des membranes	7
1. Composition générale	7
2. Les glycérophospholipides : structure et propriétés fonctionnelles.....	8
C. Hétérogénéité de la composition lipidique au sein d'une membrane.....	11
1. L'asymétrie transversale et la régulation de la charge membranaire	11
2. L'asymétrie latérale et le rôle des microdomaines lipidiques	13
II. Le trafic vésiculaire.....	14
A. Du transport intracellulaire aux processus d'exocytose et d'endocytose	14
B. Les étapes du trafic et les principaux acteurs protéiques	15
1. La formation des vésicules.....	15
2. Le rôle du cytosquelette.....	17
3. L'arrimage et la fusion membranaire.....	22
C. Le rôle essentiel des lipides membranaires dans le trafic	24
1. Hétérogénéité de la composition lipidique à l'échelle cellulaire	25
2. Les glycérophospholipides, des composés aux multiples rôles	26
III. L'acide phosphatidique (PA).....	28
A. Propriétés structurales	28
B. Fonctions cellulaires et partenaires protéiques	29
1. Les différents modes d'action du PA	30
2. Interaction du PA avec des protéines cibles	32
3. Les sondes moléculaires du PA, des outils pour étudier ses fonctions	34
C. Métabolisme du PA	35
1. Implication du PA dans la biosynthèse des lipides	35
2. Voies de synthèse du PA	37
IV. Les phospholipases D (PLD)	41
A. Identification des PLD, des végétaux aux mammifères	41
1. Des premières découvertes à la caractérisation des enzymes.....	41
2. Les différentes PLD chez les mammifères.....	42

B.	Caractéristiques enzymatiques des PLD	45
1.	Activité enzymatique	45
2.	Mesure de l'activité enzymatique des PLD	50
3.	Inhibition de l'activité PLD	51
C.	Structure primaire des PLD	54
1.	Le site catalytique	54
2.	Les régions régulatrices	56
D.	Localisation des PLD	58
1.	Localisation tissulaire	59
2.	Localisation subcellulaire.....	59
E.	Régulation de l'activité des PLD.....	62
1.	Effet du calcium.....	64
2.	La boucle de régulation PI(4,5)P ₂ - PA	65
3.	Protéines kinases	67
4.	Petites protéines G (GTPases monomériques)	70
5.	Facteurs inhibiteurs	77
F.	Implications physio-pathologiques des PLD	79
1.	Stimulation de la prolifération cellulaire.....	81
2.	Réarrangement du cytosquelette.....	84
3.	Trafic membranaire	85
Objectifs de la thèse		92
CHAPITRE I : Formation du PA et régulation des PLD au cours de la phagocytose.....		93
- Introduction -		93
I.	Le processus de phagocytose	93
A.	La phagocytose, un cas particulier d'endocytose	94
B.	Trafic membranaire au cours de la phagocytose	95
II.	Le macrophage, un acteur clé du système immunitaire inné.....	95
A.	La découverte de la phagocytose dans les cellules de l'immunité innée	96
B.	Les cellules phagocytaires du système immunitaire	96
C.	Caractéristiques des macrophages proprement dits.....	97
1.	Fonctions et pathologies associées	97
2.	Les macrophages de la lignée RAW 264.7.....	98
III.	Mécanismes moléculaires de la phagocytose et rôles des lipides	99
A.	Activation des récepteurs phagocytaires et déclenchement de la signalisation	100
1.	Définition et catégories de récepteurs phagocytaires	100
2.	La famille des récepteurs Fc (FcR)	101
3.	Signalisation en aval des FcR	103
B.	Remodelage membranaire des PIP au site de phagocytose	105

Publication 1 : Caractérisation de senseurs moléculaires du PA et observation de la dynamique du PA durant la phagocytose.....	108
I. Objectifs de l'étude	108
II. Résultats.....	110
III. Discussion.....	111
A. Modélisation de l'interaction des PABD avec le PA.....	111
B. Validation de la spécificité des senseurs pour le PA	112
C. Localisation des PABD dans les macrophages RAW 264.7 non stimulés	114
D. Dynamique du PA après stimulation de la phagocytose FcγR-dépendante	115
E. Un rôle du PA provenant du RE dans la phagocytose ?	117
IV. Conclusion et perspectives	119
Publication 2 : Régulation de la PLD par la GTPase Arf6 au cours de la phagocytose	120
I. Objectifs de l'étude	120
II. Résultats et discussion	121
CHAPITRE II : Implication des PLD et du PA au cours de l'exocytose régulée	122
- Introduction -	122
I. Le processus d'exocytose régulée.....	122
A. Définition et rôles physiologiques de l'exocytose	122
B. L'exocytose régulée, une spécificité des cellules sécrétrices	122
C. Modèles d'étude de l'exocytose régulée	123
II. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale, un modèle de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine	125
A. Généralités sur les cellules neuroendocrines	125
1. Le système endocrinien, un réseau de production d'hormones	125
2. Les cellules neuroendocrines	125
B. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale.....	126
1. Organisation générale de la glande surrénale.....	126
2. Les modèles utilisés en culture cellulaire : avantages et inconvénients	127
III. Mécanismes moléculaires de la sécrétion et implication des lipides	129
IV. Implication de la PLD dans la sécrétion neuroendocrine	129
Article en préparation : Fonctions de la PLD et de différentes espèces de PA durant l'exocytose régulée	130
I. Objectifs de l'étude	130
II. Résultats.....	131
III. Discussion et résultats complémentaires	132
A. L'activité de la PLD1 régule plusieurs étapes au cours de l'exocytose	132
B. Différentes espèces de PA sont impliquées dans l'arrimage et la fusion.....	133

C.	Des formes mono- et polyinsaturées de PA sont produites au niveau de la membrane plasmique durant l'exocytose	134
D.	Quel mécanisme d'action du PA dans l'ancrage des granules au site d'exocytose ?	135
E.	Un rôle de la PLD dans l'endocytose compensatrice ?	140
IV.	Conclusion et perspectives	142
V.	Matériel et Méthodes.....	144
A.	Biologie moléculaire.....	144
B.	Culture cellulaire et transfection.....	144
1.	Culture primaire des cellules chromaffines bovines (CCB).....	144
2.	Lignée cellulaire PC12 (phéochromocytome de rat).....	144
C.	Produits chimiques utilisés.....	145
D.	Imagerie sur cellules vivantes et analyses post-acquisition	146
1.	Vidéomicroscopie au microscope confocal à spinning disk.....	146
2.	Suivi des trajectoires et analyse des données	146
E.	Suivi de l'internalisation de la DBH par immunofluorescence.....	147
1.	Protocole expérimental	147
2.	Immunocytochimie	148
3.	Acquisitions au microscope confocal	149
4.	Analyses des images et quantification	149
F.	Observation de feuillet membranaires en microscopie électronique.....	150
1.	Préparation de feuillet de membrane plasmique	150
2.	Immunocytochimie et observation au microscope.....	150
	Conclusion générale.....	152
	Références bibliographiques.....	154
	Annexes	189
	Activités de pédagogie et de médiation scientifique.....	189
	Liste des communications scientifiques.....	190
	Liste des publications annexes	191

Avant-propos

Une cellule eucaryote est une structure isolée du monde extérieur et composée de nombreux compartiments délimités par des membranes lipidiques. Cependant, des échanges permanents de matières et d'informations s'effectuent, aussi bien entre les compartiments intracellulaires que d'une cellule à une autre. Cette communication est essentielle à l'intégrité et au fonctionnement des cellules, mais aussi des organismes pluricellulaires dans leur ensemble. Elle est possible grâce à des interactions entre les différentes membranes cellulaires, soit au niveau de ce que l'on appelle à présent des zones de contact membranaires, soit grâce au trafic de vésicules lipidiques qui sont produites dans un compartiment donneur et qui pourront fusionner avec un compartiment accepteur.

Aussi désigné par « trafic membranaire intracellulaire », le trafic vésiculaire regroupe un ensemble de processus majeurs dans nos cellules et nécessaires au fonctionnement normal de l'organisme. En effet, en plus des interactions entre les divers compartiments intracellulaires, ces processus permettent la sécrétion de molécules de signalisation par exocytose, ou encore l'internalisation de matériel extracellulaire par endocytose. En 2013, le prix Nobel de physiologie ou médecine a été décerné à James Rothman, Randy Schekman, et Thomas Südhof, pour leurs découvertes dans le domaine du trafic vésiculaire. Leurs travaux, effectués respectivement sur des modèles cellulaires de levure et de neurones, ont mis en évidence l'implication d'acteurs protéiques essentiels, les protéines du complexe SNARE. Au-delà de cette machinerie moléculaire minimale, la régulation extrêmement complexe de ce trafic requiert la coordination de multiples partenaires protéiques et lipidiques dont les rôles précis restent encore à déterminer.

L'équipe dirigée par les Drs Stéphane Gasman et Nicolas Vitale s'attache à déchiffrer les mécanismes moléculaires qui gouvernent les processus d'exocytose et d'endocytose, principalement au sein des cellules des systèmes nerveux et neuroendocrine. Les thématiques de l'équipe permettent ainsi d'aborder plusieurs phénomènes physiologiques fondamentaux, tels que la sécrétion de médiateurs chimiques par les neurones et cellules neuroendocrines, ou encore la défense immunitaire *via* l'ingestion de particules par les cellules capables de phagocytose. Durant mes études de Pharmacie, j'ai développé un intérêt particulier pour les mécanismes de trafic intracellulaire, et c'est en voulant approfondir mes connaissances dans ce domaine que j'ai rejoint l'équipe en octobre 2015, suite à l'obtention d'un contrat doctoral ministériel.

Les travaux de notre équipe ont contribué à promouvoir l'idée qu'une modification de la structure ou de la composition des membranes semble être impliquée dans la fusion de deux compartiments membranaires distincts. Des efforts considérables ont été apportés récemment pour démontrer l'importance des lipides et de leur métabolisme dans les différents processus de trafic vésiculaire, y compris l'exocytose régulée et la phagocytose. Ces différents lipides ont plusieurs modes d'action possibles : ils peuvent modifier la topologie membranaire du fait de leur

géométrie, entraîner le recrutement et/ou l'activation de protéines ou encore agir comme seconds messagers. En tant que lipides majoritaires des membranes et au vu de leurs propriétés physico-chimiques, les glycérophospholipides sont des candidats privilégiés pour la régulation de ces processus. Mes travaux se sont ainsi focalisés sur le plus simple d'entre eux, l'acide phosphatidique (PA), composé d'une petite tête polaire comprenant uniquement un groupement phosphate. La formation du PA peut être localement et temporellement stimulée par l'activation de certaines enzymes de remodelage membranaire comme la phospholipase D (PLD).

Lorsque j'ai débuté mon doctorat, les travaux antérieurs du Dr Nicolas Vitale avaient mis en évidence l'implication de l'isoforme phospholipase D1 (PLD1), dans l'exocytose régulée de différents types de cellules sécrétrices et notamment les cellules neuroendocrines. En effet, cette enzyme est activée lors de l'exocytose, entraînant la production de PA à la membrane plasmique. De plus, une série de résultats préliminaires suggéraient l'intervention de plusieurs formes de PA au cours de ce processus. J'ai poursuivi ces travaux au cours de ma thèse, dans le but de mieux comprendre l'implication de la PLD1 dans l'exocytose régulée. Les objectifs de mon projet consistaient à préciser les étapes durant lesquelles le PA intervient, la localisation du PA au cours de l'exocytose, ainsi que la nature et le rôle des espèces de PA formées par la PLD1. Grâce à la combinaison de plusieurs approches complémentaires, nous avons ainsi pu déterminer la participation de formes mono- et polyinsaturées de PA lors de l'exocytose, et discriminer leurs rôles potentiels dans les différentes étapes de l'exocytose où la PLD1 est impliquée. Ces résultats feront prochainement l'objet d'une soumission dans la revue *PNAS*.

Durant ma première année de thèse, j'ai collaboré plusieurs mois à une étude entamée quelques années auparavant par Nawal Kassas, doctorante au laboratoire, et encadrée par le Dr Nicolas Vitale. Cette étude visait à caractériser les facteurs biophysiques influençant la liaison de plusieurs domaines polypeptidiques avec le PA, ces peptides pouvant ainsi servir de sondes moléculaires pour ce phospholipide. En effet, après leur couplage à une protéine fluorescente, j'ai entre autres précisé leur localisation dans un contexte cellulaire. J'ai eu l'opportunité de pouvoir finaliser ce projet, en déterminant notamment la localisation des sondes du PA dans des macrophages au repos et durant la phagocytose. L'ensemble de ces travaux a mené à une publication en mars 2017 dans la revue *Journal of Biological Chemistry*. De façon intéressante, notre équipe avait également démontré que la production de PA par la PLD joue un rôle crucial au cours de la phagocytose et un mode de régulation de la PLD par la GTPase RalA avait pu être identifié. Des résultats prometteurs obtenus par le Dr Nancy Grant suggéraient que la GTPase Arf6 puisse également être un régulateur des PLD1 et PLD2 dans ce contexte. Conjointement à mes travaux sur l'exocytose, j'ai poursuivi et achevé ce projet, qui est devenu un second axe majeur de ma thèse. Après deux ans de travail, nous avons pu confirmer le lien entre Arf6 et les PLD durant la phagocytose, et ces résultats ont été publiés en avril 2019 dans la revue *Journal of Immunology*.

Au cours de mes quatre années de thèse, j'ai donc conduit deux axes de recherche en parallèle qui avaient pour point commun l'étude de la signalisation impliquant les PLD dans le trafic membranaire, d'une part au cours de l'exocytose régulée, et d'autre part durant la phagocytose. Ce manuscrit fait la synthèse de ces travaux et est composé de trois parties.

La première partie consiste en une introduction générale, afin d'aborder tout d'abord l'organisation des membranes cellulaires, les différents lipides qui les composent et leur implication dans le trafic vésiculaire. Je termine cette partie en présentant de façon plus détaillée la structure et les fonctions du PA, ainsi que les caractéristiques et rôles physiologiques des PLD.

La deuxième partie de mon manuscrit présente les résultats que j'ai obtenus, principalement sous la forme d'articles scientifiques publiés ou en soumission. Elle est scindée en deux grands chapitres, afin de distinguer les deux processus que j'ai étudiés. Pour respecter la chronologie de l'avancement de mes résultats, le chapitre portant sur l'étude de la phagocytose est placé en premier. Chaque chapitre débute par une introduction exposant le processus étudié et les connaissances actuelles sur la place de la PLD dans celui-ci. Il se poursuit par la présentation et la discussion des données obtenues, permettant une réflexion sur la pertinence technique et scientifique de ces résultats et les perspectives envisagées. Vous trouverez également à la fin du deuxième chapitre la description des matériels et méthodes relatifs à une partie des résultats obtenus au cours de mon projet portant sur l'exocytose.

La troisième partie clôt ce manuscrit au travers d'une conclusion générale, afin de replacer l'ensemble de mes données dans un contexte plus global et d'en dégager l'intérêt fondamental mais également les applications à long terme.

En complément, vous trouverez ensuite plusieurs annexes, notamment la liste détaillée des activités pédagogiques auxquelles j'ai participé, ainsi que l'ensemble des interventions scientifiques que j'ai effectuées au cours de mon doctorat. J'ai également joint les revues que j'ai co-écrites pendant ces quatre ans.

Les données présentées dans ce manuscrit permettent de mieux saisir l'implication essentielle de la PLD et les modes d'action du PA au cours des processus d'exo-endocytose. Nos résultats ont notamment contribué à lever le voile sur les niveaux de régulation supplémentaires médiés par les différentes sous-espèces de phospholipides membranaires. Le développement d'outils inspirés des sondes moléculaires que nous avons pu caractériser pourra vraisemblablement conduire à des avancées significatives dans la compréhension de la dynamique des lipides dans le trafic vésiculaire.

Je vous souhaite une bonne lecture.

Introduction générale

- Introduction générale -

Trafic membranaire et remodelage lipidique, le rôle de la phospholipase D

I. Les membranes lipidiques

Les membranes biologiques sont composées d'un assemblage de lipides organisés en double feuillet, la bicouche lipidique, où peuvent s'insérer diverses protéines. Les propriétés physico-chimiques des membranes en font des éléments essentiels pour la structure des cellules, mais elles sont également indispensables à de nombreuses fonctions cellulaires. Une membrane constitue en premier lieu une barrière physique entre deux milieux. À l'intérieur des cellules eucaryotes, les membranes délimitent ainsi les compartiments de plusieurs organites dans le cytoplasme, tels que le noyau, le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. De plus, la cellule est elle-même cloisonnée par la membrane plasmique, séparant le cytoplasme du milieu extracellulaire. Cependant, loin d'être des structures figées, les membranes cellulaires sont au contraire hautement dynamiques. Le métabolisme complexe des lipides membranaires participe à la régulation et au contrôle de nombreux processus cellulaires comme la mobilité, la production d'énergie, ou encore le trafic vésiculaire. Les lipides produits peuvent exercer leur rôle *via* la formation de courbures membranaires, le recrutement de partenaires protéiques ou encore en tant que seconds messagers pour la transduction d'un signal.

A. *La structure des membranes cellulaires : rappels historiques*

1. *Des premières hypothèses au modèle de Singer et Nicolson*

Le concept d'une membrane lipidique en tant que barrière hydrophobe a été proposé à la fin du XIX^{ème} siècle. Mais c'est en 1925 que les biologistes Gorter et Grendel ont émis pour la première fois l'hypothèse d'une membrane composée d'un double feuillet de lipides. Pour cela, ils ont utilisé des globules rouges, qui ne présentent aucun organite membranaire mais uniquement une membrane plasmique. Grâce à une simple mesure de ratio entre la surface totale d'une quantité déterminée de globules rouges et celle des lipides extraits de ces cellules, ils ont pu en déduire que la membrane cellulaire était formée d'une couche lipidique double, ou bicouche (Gorter et Grendel, 1925). À partir de 1940, les progrès de la microscopie électronique permettent une visualisation directe des membranes qui confirme ces premières observations, tout en suggérant la présence de protéines membranaires.

Par la suite, plusieurs modèles d'agencement des lipides et protéines furent débattus jusqu'au début des années 1970, lorsque Singer et Nicolson proposèrent un modèle qui sera progressivement adopté par l'ensemble de la communauté scientifique. Selon ce modèle, une

membrane biologique se présente comme une mosaïque fluide, constituée d'une matrice de phospholipides constituant un solvant neutre bidimensionnel, dans lequel des protéines transmembranaires ou associées à la membrane peuvent diffuser librement (Singer et Nicolson, 1972). La bicouche lipidique est décrite comme deux parties externes hydrophiles, qui sont séparées par une partie interne hydrophobe, afin de former une barrière imperméable au passage des molécules d'eau. Cet agencement est dû aux propriétés des phospholipides, qui dans un milieu aqueux s'assemblent naturellement en deux feuillets dont les parties hydrophobes sont orientées vers l'intérieur. Les protéines transmembranaires ou associées à la membrane sont intercalées dans cette matrice lipidique afin d'assurer leur fonction. Les résidus ioniques des protéines se placent en contact avec la phase aqueuse, alors que les résidus protéiques hydrophobes sont situés au cœur de la membrane (figure 1). L'agencement en bicouche conditionne ainsi l'ancrage fonctionnel de certaines protéines transmembranaires, telles que des canaux ioniques ou des récepteurs.

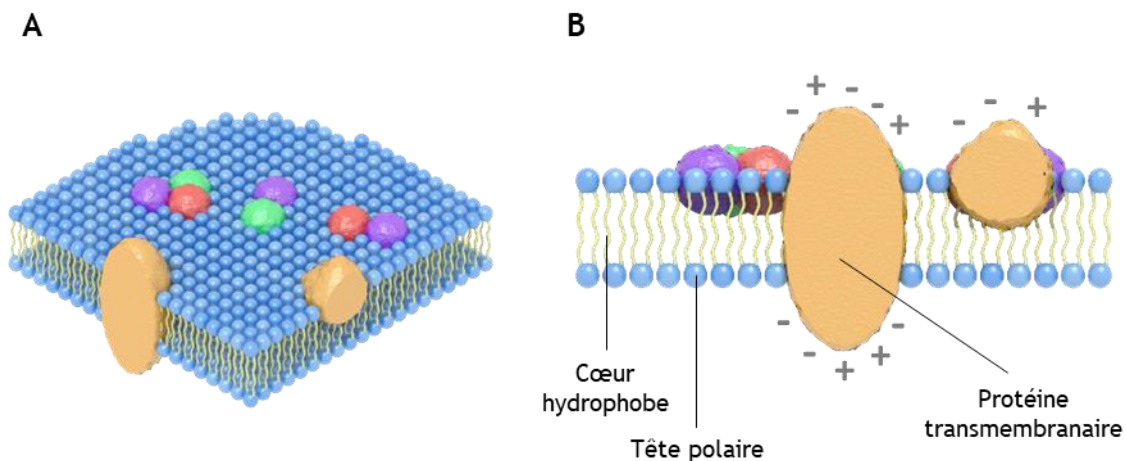


Figure 1 : Modèle initial de la mosaïque fluide, en vue isométrique (A) et en coupe transversale (B)

(Adapté de Singer et Nicolson, 1972)

Dans le modèle proposé en 1972 par Singer et Nicolson, la structure d'une membrane biologique est présentée comme une bicouche lipidique où les parties polaires des phospholipides (en bleu) sont exposées au milieu aqueux alors que les parties apolaires (en jaune) se font face, formant un cœur hydrophobe. Différentes protéines membranaires, intégrales ou non, viennent s'enchaîner dans cette matrice fluide de façon à exposer leurs résidus chargés à l'extérieur de la bicouche. Selon ce premier modèle, la distribution des protéines se fait de façon aléatoire, par diffusion libre au sein de la membrane.

2. Du modèle initial vers la notion de « microdomaines lipidiques »

Bien que le modèle général de Singer et Nicolson soit toujours d'actualité, il a connu certaines évolutions au fil du temps (Nicolson, 2014). Différents travaux de recherche ont notamment montré que les protéines ne semblaient pas diffuser au sein des membranes aussi librement que le modèle initial l'indiquait et pouvaient même être confinées transitoirement dans

des domaines restreints, en particulier au sein de la membrane plasmique (Jacobson *et al.*, 1995). Plusieurs modifications ont alors été apportées afin de rendre compte de cette asymétrie latérale, preuve d'une organisation complexe et dynamique des membranes.

Dans un premier temps, les restrictions de diffusion ont été principalement expliquées par la découverte de l'existence d'un réseau de cytosquelette apposé sous la membrane. Le groupe de Kusumi propose alors que les protéines membranaires et les lipides soient confinés par collision, soit avec les filaments d'actine du cytosquelette sous-membranaire, soit avec des protéines liées au cytosquelette et ancrées à la membrane (Kusumi *et al.*, 1993 ; Kusumi et Sako, 1996). Dans ce modèle, le cytosquelette cortical constitue des mailles de quelques centaines de nanomètres qui bloquent partiellement la diffusion latérale des protéines et des lipides de la membrane plasmique, en jouant le rôle d'enclos (Fujiwara *et al.*, 2002). Par la suite, une restriction de diffusion latérale a également été démontrée pour des protéines uniquement ancrées à la membrane par un motif GPI (glycosylphosphatidylinositol), ne pouvant donc pas être piégées par le cytosquelette cortical. Ceci a donc amené la notion d'attractions directes entre les protéines, par exemple *via* des interactions électrostatiques ou hydrophobes, faisant obstacle à leur diffusion aléatoire (Simson *et al.*, 1995).

Initialement évoqué en 1988, le rôle actif des lipides dans l'asymétrie latérale des membranes a ensuite émergé à travers la notion de microdomaines lipidiques membranaires, dénommés également radeaux lipidiques ou « rafts » (van Meer et Simons, 1988). Au sein de ces structures se trouvent concentrées des protéines intégrales, ainsi que des protéines à ancre GPI. Ces domaines de plusieurs dizaines de nanomètres présentent une composition lipidique particulière dans les deux feuillets, ce qui leur confère des propriétés physico-chimiques spécifiques. Ils se caractérisent notamment par un enrichissement en cholestérol et en sphingolipides, au détriment des glycérophospholipides (figure 2). Les sphingolipides possèdent des chaînes d'acides gras saturés, plus longues et plus étroites qui s'amassent d'une façon plus compacte que celles des autres phospholipides membranaires. Ainsi, du fait de leur composition, les microdomaines lipidiques possèdent une épaisseur légèrement plus importante que la bicouche lipidique environnante. Ils sont également moins fluides que le reste de la membrane et sont caractérisés par une résistance à la solubilisation *via* des détergents non-ioniques comme le Triton X-100 (Simons et Ikonen, 1997). C'est cette dernière particularité qui a permis de nombreuses études biochimiques sur ces microdomaines lipidiques, bien qu'il soit à présent admis que l'usage des détergents a pu conduire à des artéfacts remettant en question une partie de ces études.

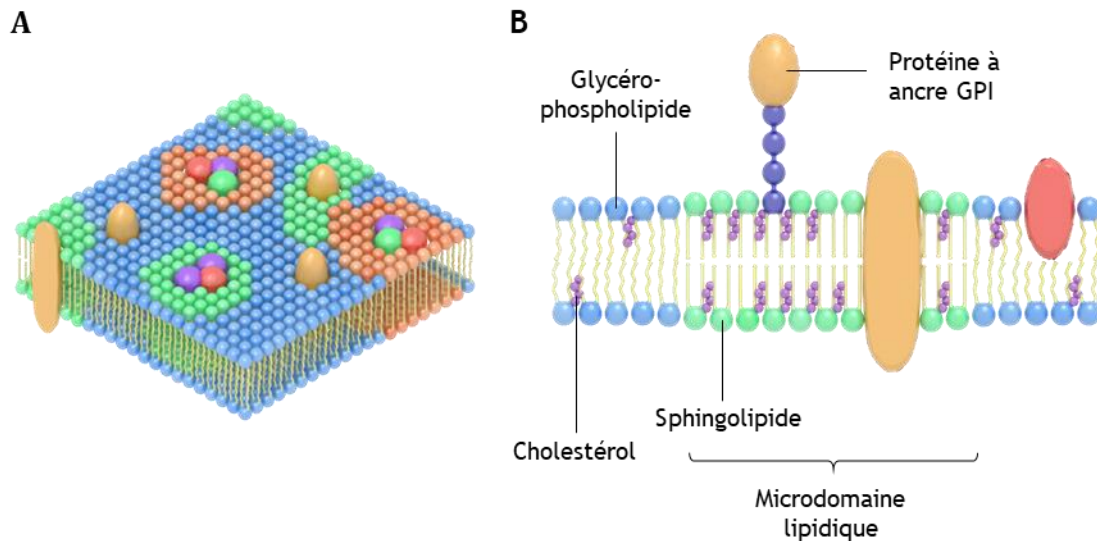


Figure 2 : Hétérogénéité latérale d'une membrane biologique, en vue isométrique (A) et en coupe transversale (B)

(Adapté de Nicolson, 2014 ; Sezgin et al., 2017)

La membrane est constituée principalement d'une bicouche de glycérophospholipides. Les sphingolipides et le cholestérol peuvent se concentrer dans des microdomaines lipidiques. Au sein de ces domaines peuvent s'agréger certaines protéines membranaires intégrales ou associées à la membrane *via* une ancre GPI par exemple.

B. Composition lipidique des membranes

1. Composition générale

Les membranes biologiques sont toutes composées globalement d'un assemblage de lipides et de protéines. Les proportions de ces deux constituants sont variables, cependant ce sont les lipides qui montrent la plus grande diversité (Fahy et al., 2009). À l'instar de la protéomique, on parle désormais de « lipidomique », puisque l'on dénombre dans les cellules eucaryotes plusieurs dizaines de milliers d'espèces lipidiques différentes. En fonction de leur taille, leur forme géométrique ou leur degré d'insaturation, ces lipides conditionnent l'épaisseur, la fluidité et la courbure membranaire (van Meer et al., 2008). Ainsi, les membranes possèdent chacune leur identité propre, qui découle directement de leur composition lipidique. Celle-ci présente des spécificités selon les types cellulaires, et varie de façon spatio-temporelle à l'échelle d'une cellule. En effet, elle est différente d'un organe à l'autre, mais elle peut également être modifiée en réponse à un stress ou une stimulation.

Les lipides membranaires sont majoritairement représentés par trois grandes classes : les stérols, les sphingolipides et les glycérophospholipides (Harayama et Riezman, 2018). Les stérols ne sont pas des constituants structurels de la bicouche, mais permettent de réduire localement sa fluidité en s'insérant au niveau du cœur hydrophobe. Dans les cellules des mammifères, le cholestérol en est le principal représentant et se concentre au niveau des radeaux lipidiques. La

bicouche lipidique est formée par les sphingolipides et glycérophospholipides, regroupés sous le nom général de phospholipides. Ce sont des lipides amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils possèdent une partie hydrophile (tête polaire) et une partie hydrophobe (queue apolaire). Les sphingolipides représentent la deuxième classe de lipides membranaires. Leur partie hydrophobe est constituée d'un groupement céramide formé par un acide gras (groupement acyle) relié à une molécule de sphingosine, un alcool aminé à longue chaîne carbonée insaturée. Les sphingolipides sont représentés majoritairement par la sphingomyéline (SM), dont la tête polaire est constituée d'un phosphate estérifié par un groupement choline. Enfin, les glycérophospholipides représentent la classe majoritaire dans la composition des membranes. Ils présentent une structure similaire à celle des sphingolipides, à la différence que leur partie hydrophobe est constituée par deux chaînes d'acides gras, reliées par des liaisons ester à un glycérol en positions *sn-1* et *sn-2* (*stereospecific numbering*) (**figure 3**). Au niveau de la tête polaire, le glycérol est également estérifié avec au minimum un groupement phosphate en position *sn-3*, formant l'acide phosphatidique (PA). La forme la plus abondante de cette classe est la phosphatidylcholine (PC), analogue structural de la SM, qui représente la moitié des glycérophospholipides des membranes eucaryotes ([van Meer et al., 2008](#)).

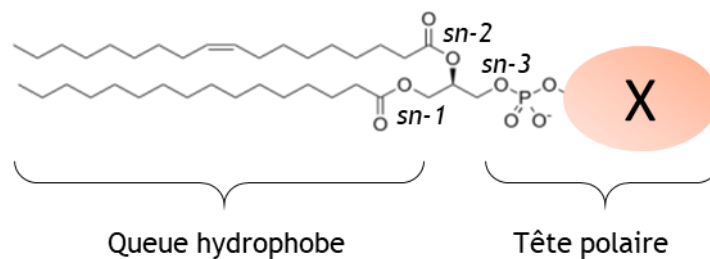


Figure 3 : Structure générale d'un glycérophospholipide

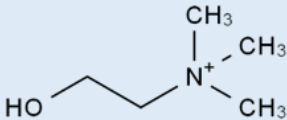
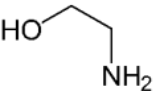
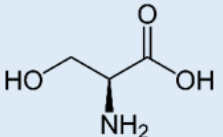
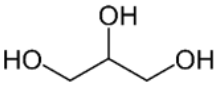
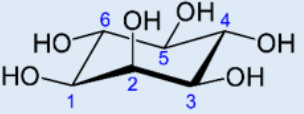
Ces lipides amphiphiles sont formés d'une partie hydrophobe formée par deux chaînes d'acides gras. Le schéma indique les chaînes les plus communément retrouvées : une chaîne saturée à 16 carbones (acide palmitique, C16:0) et une chaîne monoinsaturée à 18 carbones (acide oléique, C18:1), respectivement en position *sn-1* et *sn-2* d'un glycérol. La tête polaire en position *sn-3* du glycérol est constituée d'un phosphate, sur lequel peut être ajouté un groupement hydrophile (X). La nature de ce groupement conditionne le nom et les propriétés du glycérophospholipide.

2. Les glycérophospholipides : structure et propriétés fonctionnelles

Les glycérophospholipides constituent généralement la fraction la plus importante des lipides cellulaires. C'est la raison pour laquelle le terme de « phospholipides » est souvent employé par abus de langage pour les désigner. En effet, cette classe est formée de quelques centaines d'espèces de lipides, dont la diversité est apportée essentiellement par la nature de la tête polaire ([Dowhan, 1997](#)). Ils sont ainsi nommés en fonction de ces molécules hydrophiles, qui leur confèrent des propriétés spécifiques (**tableau 1**). Parmi les glycérophospholipides membranaires, on trouve principalement la PC, la phosphatidyléthanolamine (PE), la

phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG) et le phosphatidylinositol (PI). Ceux-ci peuvent être métabolisés pour générer des lipides de signalisation, tels que le PA, l'acide lysophosphatidique (LPA), ou encore des phosphoinositides (PIP). La diversité de cette classe est amplifiée par la variabilité des deux chaînes hydrocarbonées de la partie hydrophobe. Les acides gras peuvent ainsi varier en longueur (généralement 14 à 24 carbones chez les mammifères), en nombre de doubles liaisons (degré d'insaturation), et selon la place de ces doubles liaisons. Les glycérophospholipides ont ainsi des propriétés physico-chimiques intéressantes, qui leur permettent d'influencer divers processus cellulaires, de façon directe ou indirecte.

Tableau 1 : Les principaux groupements polaires des glycérophospholipides membranaires

Nature du groupement polaire (X)	Structure chimique du groupement	Dénomination du glycérophospholipide
Choline		Phosphatidylcholine (PC)
Éthanolamine		Phosphatidyléthanolamine (PE)
Sérine		Phosphatidylsérine (PS)
Glycérol		Phosphatidylglycérol (PG)
Inositol		Phosphatidylinositol (PI)

En premier lieu, la nature des glycérophospholipides a un effet sur la topologie membranaire. En effet, leur forme tridimensionnelle est déterminée par la taille de la tête polaire, ainsi que par la longueur et le niveau d'insaturation des chaînes d'acides gras qui les constituent. En effet, plus une chaîne comporte de doubles liaisons et plus elle occupe un volume important au sein de la bicouche, ce qui va entraîner des défauts de compactage des lipides (*lipid-packing defects*). Selon ces caractéristiques, ces lipides sont classés en trois catégories : cylindriques, coniques et coniques inversés (Piomelli *et al.*, 2007). Les premiers sont formés d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe de volume équivalent. Les lipides coniques présentent une

petite tête polaire compacte et des chaînes d'acides gras plutôt insaturés, alors que les lipides coniques inversés ont une tête polaire volumineuse et des chaînes d'acides gras saturés, voire une unique chaîne. Les différentes géométries des glycérophospholipides influencent fortement les propriétés physiques des membranes par leur capacité ou non à engendrer des courbures spontanées dans une monocouche lipidique (**figure 4**). Ainsi, les lipides cylindriques comme la PC vont avoir tendance à former une matrice lipidique plane et stable. Cependant, une monocouche lipidique riche en lipides coniques inversés, comme le LPA, prendrait plutôt une courbure positive (convexe), définie par une surface de courbure orientée en direction des têtes polaires. À l'inverse, une monocouche riche en lipides coniques, comme la PE ou le PA, adopterait préférentiellement une courbure négative (concave), c'est-à-dire orientée en direction des chaînes hydrocarbonées (Frolov *et al.*, 2011). La stabilité de la surface membranaire, formée majoritairement de PC, sera donc perturbée par la formation ou l'arrivée de lipides non cylindriques. S'ils sont présents en quantité suffisante dans les membranes, ceux-ci vont entraîner une courbure locale de la membrane qui va favoriser les phénomènes de bourgeonnement ou de fusion membranaire (Chernomordik et Kozlov, 2008).

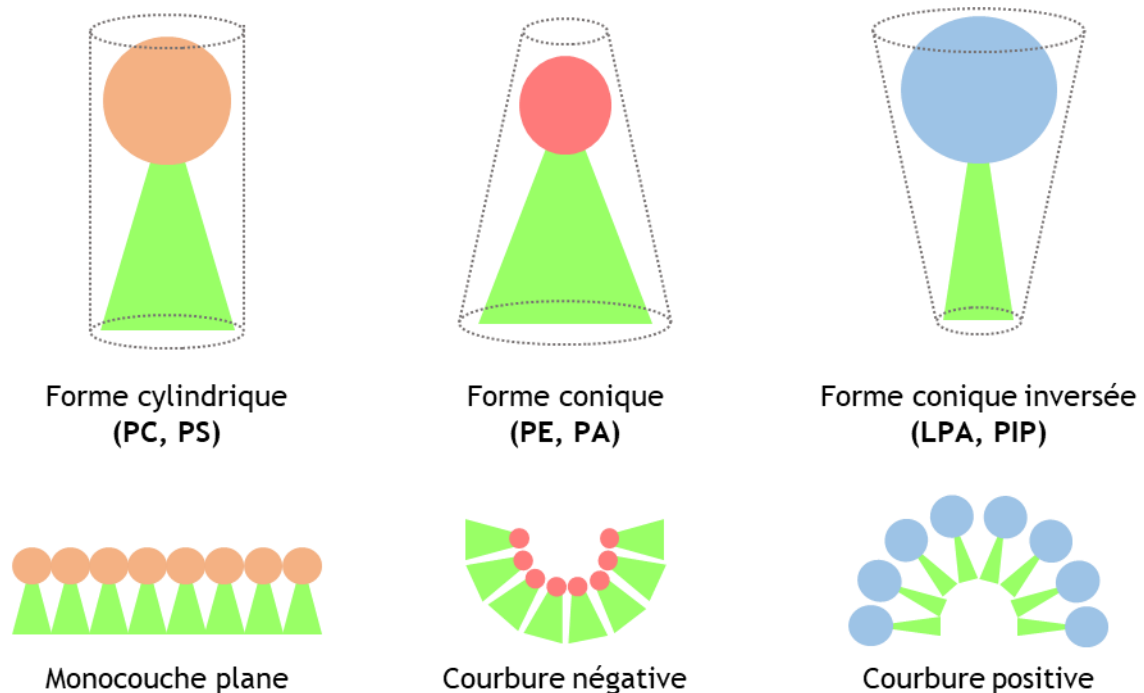


Figure 4 : Géométrie des glycérophospholipides et influence sur la courbure membranaire

Les volumes respectifs occupés par la tête polaire et les chaînes d'acides gras déterminent la forme tridimensionnelle des glycérophospholipides. Au sein d'une membrane, les lipides cylindriques forment une couche plane, alors que les lipides non cylindriques peuvent spontanément former une courbure. Les lipides coniques vont induire une courbure négative par le rapprochement des têtes polaires, et de façon opposée les lipides coniques inversés engendrent une courbure positive.

De plus, certains glycérophospholipides membranaires possèdent une charge électrique au niveau de la tête polaire et peuvent alors recruter ou activer des protéines cibles, grâce à des interactions électrostatiques. Au pH physiologique, la PC et la PE sont neutres, alors que la PS, le PG, les PIP et le PA ont une charge globale négative. L'accumulation de lipides chargés dans le feuillet cytosolique, notamment au niveau de la membrane plasmique, va ainsi pouvoir entraîner le recrutement membranaire de certaines protéines. La nature des chaînes d'acides gras peut moduler ces interactions lipides-protéines en faisant varier par exemple l'orientation de la tête polaire. De façon générale, des variations dans l'arrangement entre les molécules lipidiques semblent influencer l'interaction de ces lipides avec certaines protéines périphériques (Bigay et Antony, 2012).

C. Hétérogénéité de la composition lipidique au sein d'une membrane

Les différents lipides sont représentés de manière inégale au sein des membranes en termes de proportion mais également en termes de localisation, entraînant ainsi une asymétrie à plusieurs niveaux.

1. L'asymétrie transversale et la régulation de la charge membranaire

Les lipides présentent une distribution inégale entre les deux feuillets de la bicouche lipidique, formant une asymétrie transversale au sein des membranes, en particulier dans la membrane plasmique. Ainsi, en conditions normales, la PC et la SM sont majoritairement exposés sur le feuillet externe de la membrane plasmique, tandis que la PE et la PS sont localisés en proportion beaucoup plus importante sur le feuillet cytoplasmique (**figure 5A**). Le PA et les PIP, présents à des niveaux faibles en condition basale, sont synthétisés en réponse à de nombreux stimuli au niveau du feuillet cytoplasmique. Le maintien de l'asymétrie lipidique entre les deux feuillets des membranes cellulaires dépend de l'action de plusieurs familles d'enzymes spécialisées dans le transport des lipides : les flippases et floppases, ainsi que les scramblases (Holthuis et Levine, 2005) (**figure 5B**). L'activité des flippases et des floppases est dépendante de l'hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP), car les lipides sont transférés d'un feuillet lipidique à l'autre contre leur gradient de concentration. Les flippases transportent les phospholipides tels que la PE et la PS du feuillet externe vers le feuillet interne, alors que les floppases effectuent le transport en sens inverse, par exemple de la PC. En revanche, les scramblases sont des transporteurs ATP-indépendants, qui peuvent effectuer un transfert bidirectionnel des phospholipides sans spécificité. Elles permettent notamment de transférer la PS du feuillet interne sur le feuillet externe de la membrane plasmique lors d'une augmentation de la concentration cytosolique de calcium (Ikeda *et al.*, 2006).

L'asymétrie transversale a pour conséquence de modifier les propriétés physiques entre les faces interne et externe des membranes, notamment en termes de fluidité et de charge électrique. Cette asymétrie joue un rôle majeur au sein de la membrane plasmique pour maintenir

un niveau de perméabilité faible. Plusieurs études ont également démontré l'importance du maintien de la distribution asymétrique des phospholipides entre les feuillets au cours des mécanismes de trafic membranaire (Pomorski et Menon, 2006 ; Devaux *et al.*, 2008). Par exemple, l'asymétrie membranaire de la PS et de la PE semble importante au cours de la formation de vésicules de sécrétion, ainsi que pour le processus d'endocytose. Des modifications localisées de cette répartition asymétrique des lipides jouent également un rôle majeur dans différents processus tels que la mort cellulaire par apoptose, la coagulation sanguine et la phagocytose (Fadeel et Xue, 2009). L'exposition de nouvelles têtes polaires sur un feuillet membranaire par un processus de transfert pourrait représenter un signal spécifique de reconnaissance de certaines protéines. Ainsi, la distribution de lipides chargés négativement tels que la PS, le PA et les PIP serait notamment un moyen de contrôler la localisation de certaines protéines solubles, *via* la génération de domaines chargés négativement au niveau du feuillet cytosolique. En effet, celles-ci peuvent être recrutées à la membrane par des interactions électrostatiques lorsqu'ils sont exposés sur le feuillet cytosolique. À l'inverse, l'altération de leur concentration dans ce feuillet réduit l'attraction électrostatique, ce qui peut engendrer une redistribution des protéines recrutées de la membrane vers le cytosol (Yeung *et al.*, 2008).

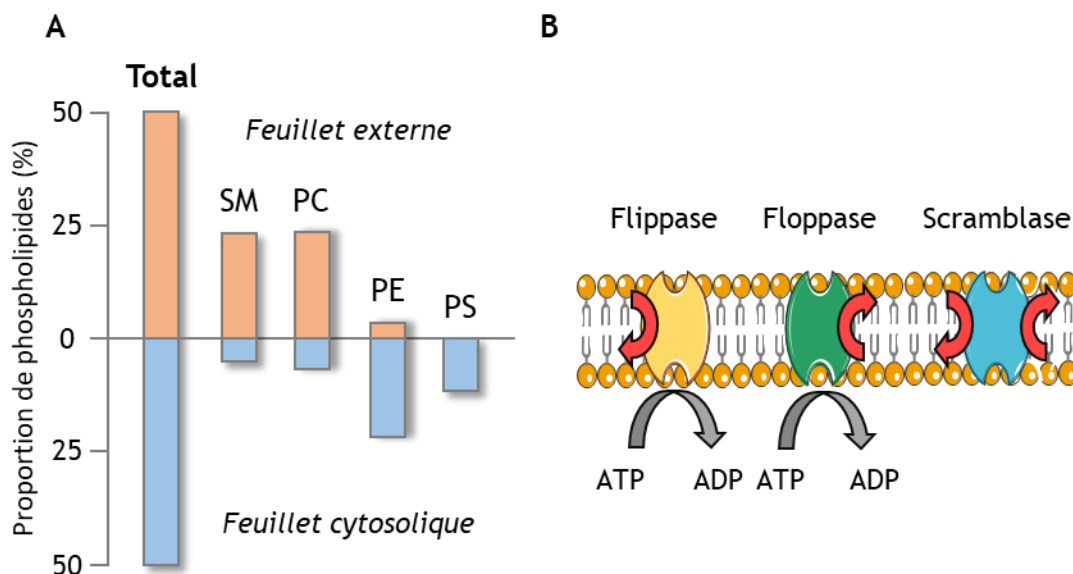


Figure 5 : Hétérogénéité transversale des membranes

A) Asymétrie transversale des phospholipides de la membrane plasmique
(Adapté de Fadeel et Xue, 2009)

Dans les cellules eucaryotes, la membrane plasmique est caractérisée par une asymétrie dans la distribution des phospholipides entre les deux feuillets de la bicouche. La SM et la PC se trouvent majoritairement au niveau du feuillet externe, tandis que la PE et la PS se concentrent dans le feuillet interne.

B) Mécanismes de translocation enzymatique des phospholipides membranaires
(Adapté de Daleke, 2003)

L'asymétrie membranaire est maintenue grâce à trois types de translocases : les flippases et floppases, dont l'activité nécessite de l'ATP et qui effectuent un transport unidirectionnel, et les scramblases, qui se chargent d'un transport bidirectionnel de façon ATP-indépendante.

2. L'asymétrie latérale et le rôle des microdomaines lipidiques

Comme décrit précédemment, il existe des zones précises appelées microdomaines lipidiques où certains lipides membranaires se retrouvent concentrés. Ces zones de compactage entraînent ainsi une asymétrie latérale dans la bicouche lipidique (Simons et Ikonen, 1997 ; Pike, 2003). Les microdomaines sont des structures hautement dynamiques qui se forment en fonction des besoins de la cellule et compartimentent les processus cellulaires. Ils servent de plateformes de tri sélectif et de signalisation pour l'adressage d'un compartiment à l'autre et jouent alors un rôle important dans le trafic membranaire. D'une part, car leurs propriétés physiques particulières forment localement un environnement dense en charges où la fluidité est réduite, ce qui permet de diminuer la tension exercée avec la membrane avoisinante et ainsi de favoriser la courbure membranaire. D'autre part, car cette organisation lipidique spécifique au sein de la membrane permet de contrôler la localisation et l'activité de certaines protéines. En effet, la formation des microdomaines lipidiques permet la séquestration et/ou l'agrégation de protéines spécifiques telles que des récepteurs transmembranaires, des protéines à ancre GPI ou encore des molécules de signalisation. Le rassemblement et la concentration de récepteurs en des endroits spécifiques de la membrane plasmique permettent d'amplifier un signal et par conséquent, de moduler la signalisation intracellulaire qu'ils induisent. Enfin, la localisation de certaines protéines dans les microdomaines lipidiques peut entraîner un changement de conformation de celles-ci, et par conséquent activer ou inhiber leur fonction (Sezgin *et al.*, 2017). Les microdomaines lipidiques favorisent aussi l'assemblage de complexes multimoléculaires nécessaires aux phénomènes de formation de vésicules d'exocytose et d'endocytose. Il apparaît par exemple que la mise en place de microdomaines lipidiques est essentielle à la formation des sites d'exocytose dans les cellules neuroendocrines (Chasserot-Golaz *et al.*, 2005 ; Gabel *et al.*, 2015).

II. Le trafic vésiculaire

Il existe au sein des cellules un intense trafic vésiculaire qui permet des interactions entre les divers compartiments intracellulaires (**figure 6**). Les différentes étapes de ce transport impliquent des organites tels que le RE granuleux (REG) et l'appareil de Golgi, ainsi que le cytosquelette, et sont contrôlées par de nombreux régulateurs.

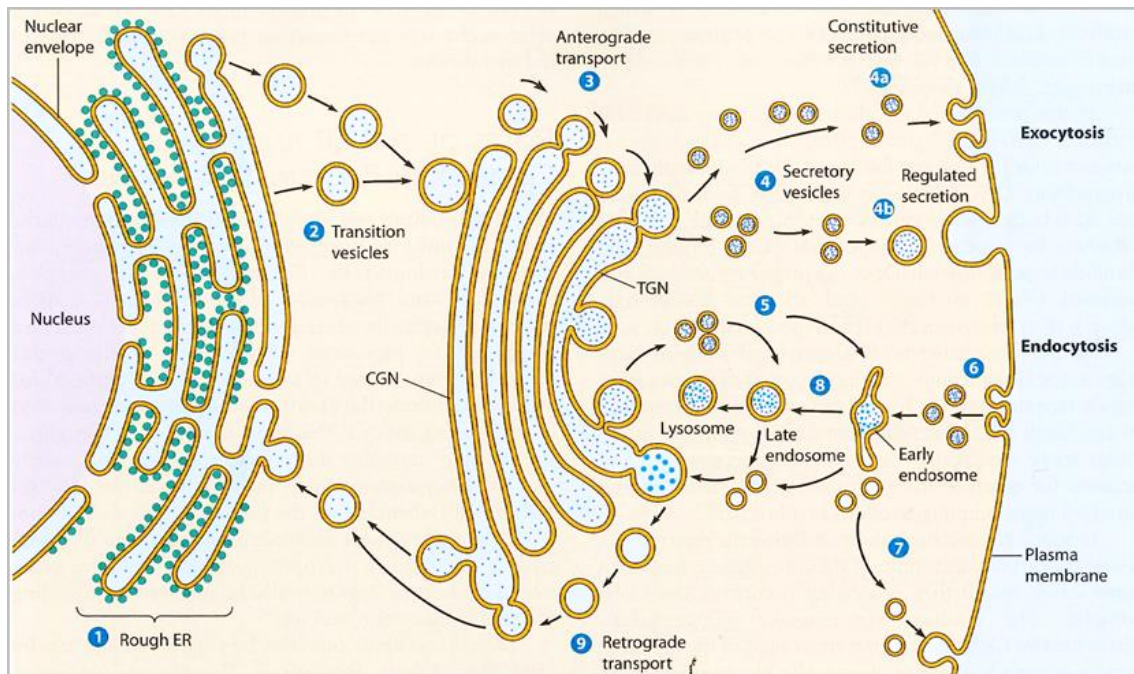


Figure 6 : Les différentes voies de transport vésiculaire au sein des cellules

(Becker, Kleinsmith, Hardin and Bertoni: *The world of the cell*, 7th edition)

Des vésicules de transport (cargos) peuvent se former au niveau du RE, de l'appareil de Golgi, de la voie endosomale ou de la membrane plasmique. Un transport antérograde de matériel s'effectue du RE jusqu'au réseau *cis*-golgien (CGN) puis dans les citernes de l'appareil de Golgi. De façon opposée, un transport rétrograde a lieu de l'appareil de Golgi au RE. Au cours de l'exocytose, les vésicules de sécrétion provenant du réseau *trans*-golgien (TGN) fusionnent avec la membrane plasmique, de façon constitutive ou régulée. L'endocytose quant à elle débute par la formation d'endosomes à la membrane plasmique, qui vont pouvoir rejoindre le TGN, fusionner avec des lysosomes ou être recyclés vers la membrane plasmique.

A. Du transport intracellulaire aux processus d'exocytose et d'endocytose

L'appareil de Golgi est considéré comme l'organite central du trafic. Il est constitué d'un empilement de citernes qui sont polarisées morphologiquement et biochimiquement. Le côté *cis* (CGN, réseau *cis*-golgien) reçoit les protéines venant du REG, alors que le côté *trans* (TGN, réseau *trans*-golgien) est orienté vers la membrane plasmique et constitue le site de sortie des protéines et lipides à la suite de modifications post-traductionnelles (Griffiths et Simons, 1986). L'appareil de Golgi fonctionne comme une gare de triage qui réceptionne des vésicules de transport (cargos) provenant essentiellement du RE et assure ensuite une livraison ciblée de celles-ci vers différents compartiments membranaires comme les lysosomes, les endosomes, la membrane plasmique,

mais également les citernes golgiennes précédentes et le RE (Kienzle et von Blume, 2014). On observe ainsi un échange permanent de vésicules s'effectuant de façon bidirectionnelle, à la fois entre le RE et les citernes du CGN, ainsi qu'entre la membrane plasmique et le TGN. Le trafic antérograde permet le transit de matériel cellulaire provenant du RE dans des vésicules jusqu'aux compartiments en périphérie. Le passage par l'appareil de Golgi donne lieu au niveau du TGN à la distribution cellulaire des protéines néosynthétisées, ainsi que des lipides dont la biogenèse a lieu principalement au niveau du RE et de l'appareil de Golgi (Fagone et Jackowski, 2009). Il est à noter cependant qu'un transfert non vésiculaire de cholestérol et de phospholipides au niveau de zones de contacts membranaires a également été mis en évidence récemment (Jain et Holthuis, 2017). Le trafic rétrograde, quant à lui, permet notamment le recyclage de constituants cellulaires dans le RE depuis l'appareil de Golgi ou la périphérie cellulaire. Il est également important pour maintenir l'identité de chaque compartiment (Burd, 2011 ; Spang, 2013).

Pour résumer, le trafic vésiculaire joue un rôle essentiel au fonctionnement normal des cellules en régulant l'homéostasie cellulaire et la fonction des différents compartiments membranaires. Cependant, ces mécanismes de transport peuvent être utilisés en parallèle par les cellules pour communiquer avec le milieu extérieur, par exemple afin d'assurer la sécrétion de molécules informatives par exocytose régulée ou bien l'internalisation de particules par endocytose. Dans le cas de l'exocytose, le trafic a lieu de l'appareil de Golgi vers le milieu extracellulaire par le biais de vésicules de sécrétion, alors qu'au cours de l'endocytose, il se produit de la membrane plasmique vers le milieu intracellulaire *via* les endosomes.

B. Les étapes du trafic et les principaux acteurs protéiques

Le trafic vésiculaire est médié par trois étapes clés : la génération de vésicules de transport par bourgeonnement à partir d'un compartiment membranaire donneur, le déplacement de ces vésicules *via* le réseau de cytosquelette vers un compartiment accepteur puis leur fusion avec celui-ci (**figure 7**).

1. La formation des vésicules

Les vésicules de transport se forment le plus souvent à l'aide d'une machinerie protéique spécialisée, qui est recrutée du cytosol à la membrane d'un compartiment donneur. L'assemblage de ces protéines dites « de manteau » au niveau d'un domaine membranaire spécifique entraîne progressivement une déformation de la membrane se manifestant par un bourgeonnement ou une invagination. Une dernière étape de scission membranaire donne naissance à une vésicule de transport, entourée par une cage protéique. Trois types de protéines de manteau ont été identifiés et caractérisés : COPI, COPII et la clathrine.

La formation des vésicules impliquées dans le trafic RE-Golgi nécessite l'assemblage des coatomères COPI et COPII, des complexes protéiques composés respectivement de 7 et 5 sous-

unités. COPII est impliqué dans le transport de cargos du RE vers le CGN, alors que COPI assure à l’opposé le transport entre les citernes golgiennes à partir du TGN et jusqu’au RE (Brandizzi et Barlowe, 2013). La clathrine, quant à elle, est indispensable pour le bourgeonnement des vésicules à partir de la membrane du TGN (Bard et Malhotra, 2006). Elle permet également la formation de vésicules d’endocytose à la membrane plasmique, par exemple dans le cas de l’internalisation d’un récepteur et son ligand suite à leur interaction (Kaksonen et Roux, 2018). La formation de vésicules recouvertes de clathrine ou *clathrin-coated vesicles* (CCV) requiert la participation de protéines adaptatrices. Celles-ci sont classées en deux groupes : les protéines monomériques GGA (*golgi-localized, γ -adaptin ear containing, Arf-binding protein*) et les complexes hétérotétramériques AP (*adaptor protein*). Parmi les 4 AP caractérisées chez l’homme, AP2 agit strictement à la membrane plasmique, où son recrutement induit l’assemblage de molécules de clathrine pour la formation de vésicules d’endocytose. En revanche, les AP1, 3 et 4 agissent au niveau du TGN et des endosomes. Le recrutement membranaire des protéines de manteau et de leurs adaptateurs est régulé par différentes familles d’enzymes hydrolysant le GTP (guanosine triphosphate) appelées protéines G ou GTPases, notamment la famille Arf (*ADP-ribosylation factor*) (Faini et al., 2013). L’étape finale de scission des vésicules est également catalysée par ces petites GTPases, ainsi que par la dynamine, une protéine à activité GTPase également (Campelo et Malhotra, 2012). Selon le compartiment donneur, les vésicules membranaires peuvent ensuite être transportées du TGN vers la membrane plasmique ou bien de la périphérie vers le système endolysosomal.

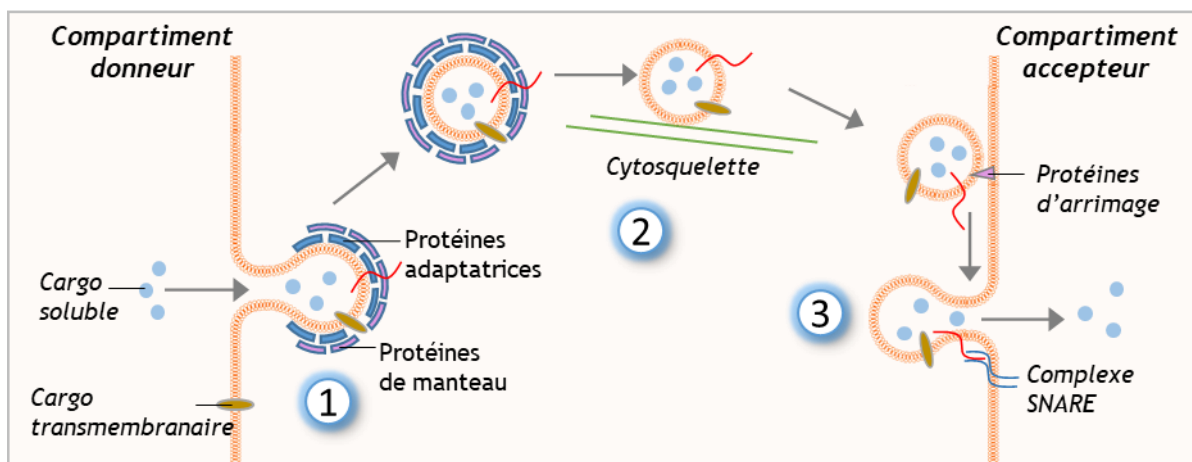


Figure 7 : Représentation des étapes génériques du trafic vésiculaire entre deux compartiments cellulaires
(Adapté de Bonifacino, 2014)

La vésicule se forme par bourgeonnement ou invagination de la membrane donneuse (1), sous l’action de protéines de manteau et éventuellement de protéines adaptatrices, qui sont retirées par la suite. Puis elle se déplace le long des filaments du cytosquelette (2) par le biais de protéines motrices. Enfin, la vésicule est arrimée par un complexe protéique à la membrane acceptrice et fusionne avec celle-ci grâce à la fermeture du complexe SNARE (3).

2. Le rôle du cytosquelette

Le cytosquelette représente littéralement la charpente de la cellule eucaryote et joue un rôle primordial de soutien de la morphologie cellulaire en interaction avec les membranes. Par ailleurs, il génère des forces intracellulaires nécessaires au mouvement des organites et à la déformation des membranes. Ces forces mécaniques peuvent être produites par l'alternance de phases de polymérisation et de dépolymérisation. Au cours du trafic membranaire, certains filaments du cytosquelette servent également de guide pour des protéines motrices associées aux vésicules. Le cytosquelette est composé de 3 éléments : les filaments intermédiaires, les microtubules et l'actine (**figure 8**). Les filaments intermédiaires comprennent plusieurs classes de structures fibrillaires de 8 à 12 nm de diamètre, exprimées de façon hétérogène dans les différents types cellulaires. Ce sont les éléments les plus stables du cytosquelette, qui permettent notamment d'ancrer les organites dans une cellule, ainsi que de maintenir l'architecture nucléaire, cellulaire et tissulaire. Ces filaments ne sont pas utilisés par des protéines motrices et de ce fait ne participent généralement pas au trafic vésiculaire (Margiotta et Bucci, 2016), à l'inverse des microtubules et de l'actine qui eux jouent un rôle majeur.

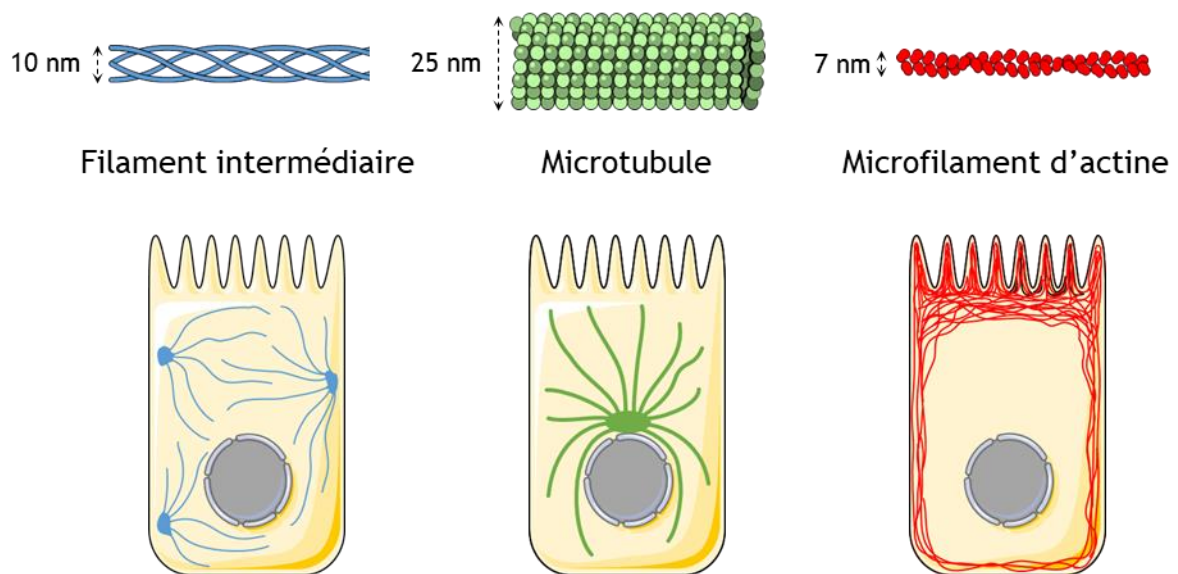


Figure 8 : Les différents constituants du cytosquelette

Le cytosquelette d'une cellule de mammifère est constitué de filaments intermédiaires (10-12 nm de diamètre, en bleu), de microtubules (25 nm de diamètre, en vert) et de microfilaments d'actine (7 nm de diamètre, en rouge). Ces constituants ont des rôles et des agencements différents dans la cellule.

a. Les microtubules et le transport « longue distance »

Les microtubules sont des filaments cylindriques organisés en un réseau linéaire dans le cytoplasme. Chaque microtubule est composé de tubuline, une protéine globulaire qui s'agence en hétérodimères formés des sous-unités α et β . Ces dimères ont la capacité de s'assembler longitudinalement pour former un protofilament (Wade, 2009). Entre 11 et 15 protofilaments s'associent ensuite de manière hélicoïdale pour former un microtubule de 25 nm de diamètre. La

nucléation des microtubules a lieu par un agencement spontané de la sous-unité γ de la tubuline, au niveau de centres organisateurs des microtubules. Bien que le site cellulaire majeur de nucléation soit le centrosome, d'autres sites ont pu être identifiés, comme l'appareil de Golgi (Chabin-Brion *et al.*, 2001). Les microtubules sont des structures extrêmement dynamiques alternant entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation des dimères de tubuline, dépendantes de l'hydrolyse du GTP. Ce sont également des structures polarisées, présentant une extrémité négative au niveau du site de nucléation et une extrémité positive orientée vers la périphérie de la cellule, caractérisée par une vitesse de polymérisation plus élevée que l'extrémité négative (Galjart, 2010).

Hormis leur rôle majeur dans la mise en place du fuseau mitotique, les microtubules sont responsables de l'intégrité et de la distribution des compartiments membranaires intracellulaires durant l'interphase (de Forges *et al.*, 2012). Ils constituent en quelque sorte des rails permettant de déplacer à travers la cellule à la fois des organites, par exemple les mitochondries, mais également des vésicules de transport de différentes origines (Caviston et Holzbaur, 2006). Chez les mammifères, la ségrégation des organites par le cytosquelette peut éloigner les compartiments membranaires d'une grande distance, allant jusqu'à plusieurs microns. Les vésicules utilisent alors les microtubules interagissant avec ces compartiments pour se déplacer rapidement. C'est par exemple le cas des vésicules COPII sortant du RE et allant jusqu'à l'appareil de Golgi (Presley *et al.*, 1997). Dans les cellules polarisées, les vésicules émergeant du TGN se dirigent dans le cytoplasme vers la membrane plasmique *via* des microtubules nucléés à partir des membranes golgiennes (Schmoranzler et Simon, 2003). Enfin, les endosomes et lysosomes empruntent également ces voies de transport à partir de la périphérie cellulaire.

Le transport d'organites et de cargos le long des microtubules est effectué par des moteurs moléculaires : la dynéine et la kinésine. La force nécessaire au mouvement est générée par hydrolyse de l'ATP au niveau des chaînes lourdes de ces protéines (Vale, 2003). La dynéine est responsable du transport dirigé vers l'extrémité négative des microtubules. Cette protéine motrice permet ainsi le trafic des vésicules COPII, des endosomes et des lysosomes vers l'appareil de Golgi (Roberts *et al.*, 2013). La dynéine interagit avec plusieurs cofacteurs, qui contribuent à la régulation de sa fonction motrice, de sa localisation et de sa liaison au cargo. À titre d'exemple, la protéine dynactine fonctionne comme un adaptateur entre le cargo et la dynéine et agit positivement sur la processivité de la dynéine, essentielle pour le transport sur de longues distances. Des GTPases de la famille Rab, comme Rab6 et Rab7, contrôlent le recrutement du complexe dynéine-dynactine sur les vésicules sortant du Golgi (Short *et al.*, 2002 ; Rocha *et al.*, 2009). Les différentes kinésines, quant à elles, se déplacent majoritairement vers l'extrémité positive des microtubules. Elles permettent ainsi le transport direct des cargos post-golgiens vers la membrane plasmique, de même que le déplacement des vésicules COPI vers le RE. Le recrutement des kinésines sur ces vésicules peut nécessiter comme intermédiaire des protéines

adaptatrices de la clathrine telle la protéine AP1 (Hirokawa *et al.*, 2009). Sur la même vésicule, différentes protéines motrices coexistent afin d'assurer un transport bidirectionnel sur les microtubules. Les cargos utilisent également une combinaison de protéines motrices pour naviguer entre les microtubules et le cytosquelette d'actine (Brown, 1999).

b. Le cytosquelette d'actine et ses multiples rôles

Le cytosquelette d'actine se présente sous forme de microfilaments de 7 nm de diamètre, résultant de la polymérisation de monomères globulaires appelés actine-G. L'actine a la capacité de fixer certains cations divalents (calcium, potassium et magnésium), ainsi que de lier l'ATP et de l'hydrolyser en ADP (adénosine diphosphate). L'actine filamenteuse (actine-F) est formée par l'assemblage rapide de monomères d'actine-G activés, c'est-à-dire liés à l'ATP et aux cations divalents. Une fois le polymère initié, l'activité ATPase de l'actine-F entraîne la formation d'ADP, qui reste liée à l'actine. Cette réaction est irréversible et joue un rôle dans le désassemblage des microfilaments d'actine (Korn *et al.*, 1987). Tout comme les microtubules, les microfilaments d'actine sont polarisés, présentant une extrémité positive dite en brosse (« *barded end* »), en interaction avec la membrane plasmique, et une extrémité négative pointue (« *pointed end* »). À l'état stationnaire, une polymérisation est favorisée à l'extrémité positive, alors qu'à l'inverse une dépolymérisation se produit généralement à l'extrémité négative (**figure 9A**). Les microfilaments subissent ainsi un remodelage selon un principe de « tapis roulant » (*treadmilling*) qui leur permet d'avancer dans une direction avec une longueur constante (Fujiwara *et al.*, 2002). La polymérisation de l'actine se déroule en trois étapes. Comme pour les microtubules, ce processus débute par une étape de nucléation, qui correspond ici à l'assemblage d'un trimère d'actine-G activé. La 2^{ème} étape consiste en l'élongation du filament par l'assemblage de monomères d'actine-G activés sur les noyaux de polymérisation. La 3^{ème} étape constitue la mise en place d'un équilibre dynamique par dissociation des monomères liés à l'ADP à l'extrémité négative, compensée par la polymérisation à l'extrémité positive.

Les microfilaments d'actine s'associent aux membranes cellulaires. Cependant, ils vont s'organiser de différentes manières dans les cellules selon les processus qu'ils régulent (**figure 9B**). Ils peuvent s'assembler en faisceaux parallèles serrés que l'on retrouve dans des extensions cytoplasmiques comme les microvillosités ou les filopodes observés sur le bord des cellules en migration. L'actine-F peut également former des faisceaux contractiles, où les filaments sont orientés de façon antiparallèle. Les forces de contraction sont apportées par les myosines, des protéines motrices de l'actine. Cet agencement permet la formation d'un anneau contractile qui facilite le processus de scission membranaire, par exemple lors de la mitose ou au cours de la formation de vésicules intracellulaires. Les faisceaux contractiles peuvent également former des fibres de stress à partir de zones d'interaction avec la matrice extracellulaire. Enfin, le réseau

d'actine-F peut s'organiser en mailles, qui peuvent être localisées comme au niveau des lamellipodes ou être retrouvées au niveau de tout le cortex cellulaire (Blanchoin *et al.*, 2014).

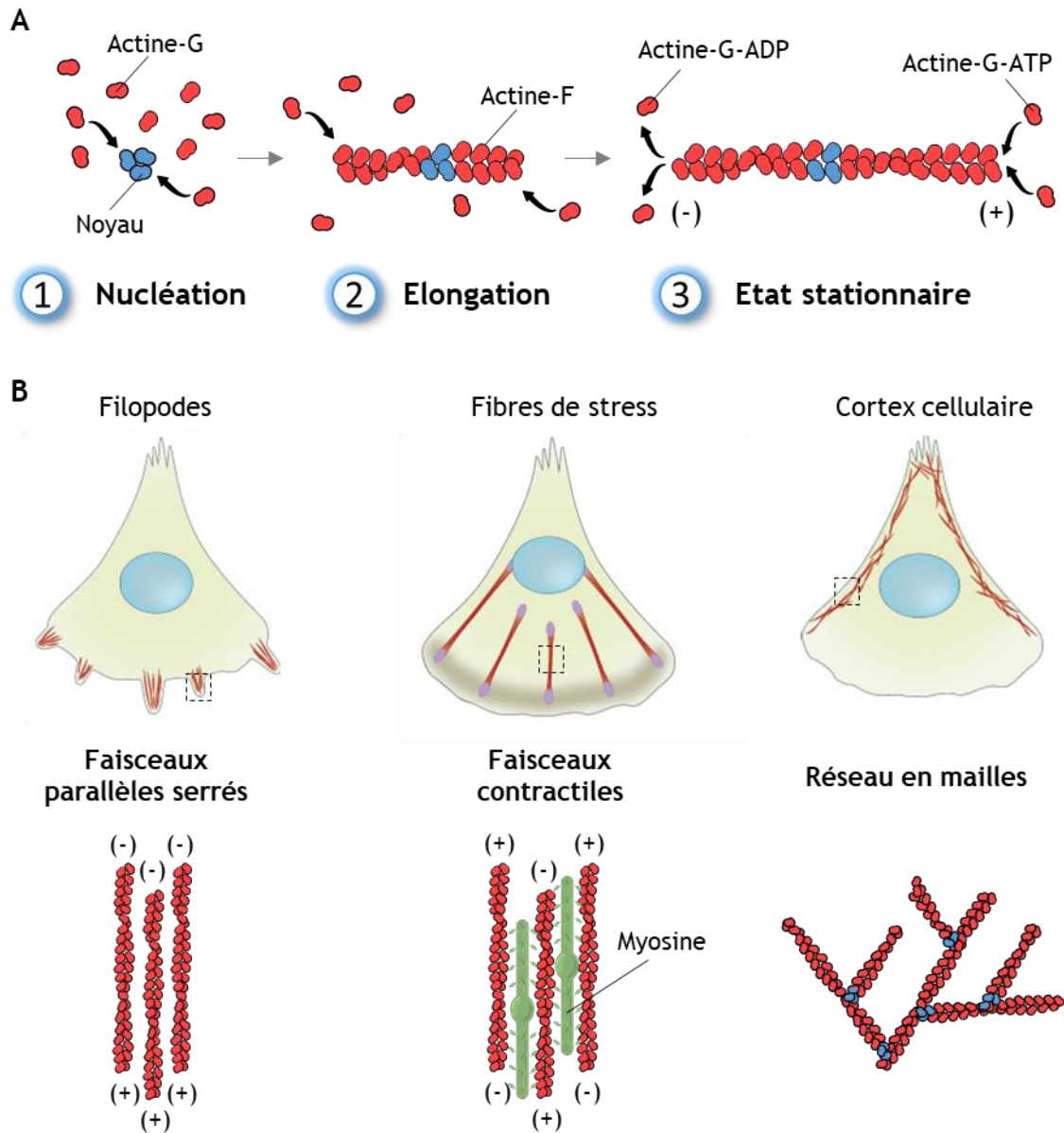


Figure 9 : Organisation du cytosquelette d'actine

(Adapté de Campellone et Welch, 2010 ; Suarez et Covar, 2016)

A) Mécanisme de polymérisation de l'actine

Au cours de la nucléation, trois monomères d'actine-G s'assemblent pour former la structure de départ du nouveau filament. L'élongation s'effectue ensuite par l'ajout de monomères sur ce noyau. L'état stationnaire correspond à l'équilibre dynamique de l'actine-F, durant lequel le filament garde une longueur constante. Cet état est caractérisé par un mécanisme de « tapis roulant » : le filament se polymérise à l'extrémité positive, riche en actine-F-ATP, et se dépolymérise à l'extrémité négative, riche en actine-F-GDP.

B) Les différents agencements du cytosquelette d'actine dans les cellules non musculaires

Les microfilaments peuvent être assemblés en faisceaux parallèles serrés pour générer des évaginations membranaires. Ils peuvent également former des faisceaux contractiles *via* une disposition anti-parallèle et la présence de myosines entre les filaments, qui vont générer la force de contraction. Enfin, lorsque des filaments sont nucléés à partir d'autres préexistants, l'actine-F va former un réseau en mailles, présent à la périphérie cellulaire.

Le cytosquelette d'actine est le principal générateur de forces intracellulaires. La polymérisation de l'actine contribue à la déformation des membranes, tandis que la myosine II permet la contraction des filaments (Hirata *et al.*, 2009). Ce réseau intervient ainsi dans les processus de mobilité cellulaire, mais est également nécessaire à de multiples étapes du trafic vésiculaire. Tout d'abord, les microfilaments participent à la biogenèse des vésicules recouvertes de clathrine partant de l'appareil de Golgi ou de la membrane plasmique (Merrifield *et al.*, 2002 ; Yasar *et al.*, 2005). Au niveau des membranes golgiennes, l'actine est nucléée par le complexe Arp2/3 (*actin related protein 2/3 complex*) et ses activateurs. Arp2/3 et la myosine Ib apportent l'énergie nécessaire à la déformation membranaire à la sortie du TGN, tandis que la myosine II joue un rôle dans la scission des vésicules néoformées (Almeida *et al.*, 2011). De plus, la polymérisation de l'actine assure le transport sur de courtes distances de plusieurs types de vésicules de transport telles que les granules de sécrétion et endosomes. Ces vésicules sont alors prises en charge par des myosines se déplaçant sur les microfilaments d'actine. Ces protéines constituent une superfamille de protéines multifonctionnelles, puisqu'elles participent à la contraction musculaire, à la génération de tension membranaire et au transport d'organites et de cargos. Tout comme les dynéines et kinésines, les myosines génèrent la force nécessaire au mouvement *via* l'hydrolyse de l'ATP au niveau de leurs chaînes lourdes (Heissler et Sellers, 2016).

Le remodelage de l'actine a un rôle essentiel dans les processus d'exocytose et d'endocytose (Merrifield *et al.*, 2002). À ce jour, une soixantaine de protéines régulatrices permettant de moduler finement la dynamique de l'actine ont été caractérisées, et beaucoup d'entre elles possèdent des sites d'interaction avec les phospholipides membranaires. Ces facteurs sont classés dans différents groupes selon qu'ils favorisent la nucléation, la stabilisation ou la dépolymérisation de l'actine (Pollard, 2016). Les agents nucléateurs de l'actine peuvent être de 3 types : le complexe Arp2/3, les formines, et les nucléateurs atypiques comme Spire (Firat-Karalar et Welch, 2011). Le complexe Arp2/3 est retrouvé dans tous les types cellulaires et dans de très nombreuses espèces. Il induit la réticulation de l'actine-F par la nucléation de l'actine sur des filaments préexistants. L'élongation du nouveau filament a lieu avec un angle de 70° avec celui d'origine, permettant la formation d'un réseau interconnecté d'actine. Le complexe Arp2/3 est activé par différentes protéines, dont les mieux connues sont celles de la famille WASP/N-Wasp qui lient les monomères d'actine-G et les mettent en contact avec Arp2/3 (Goley et Welch, 2006). Contrairement au complexe Arp2/3, les formines entraînent l'élongation rapide de filaments linéaires parallèles. La protéine mDia, par exemple, régule la formation des filopodes et des fibres de stress. Après la nucléation, les formines sont positionnées en dimère à l'extrémité positive du filament pour contrôler son élongation (Chesarone *et al.*, 2010). Une fois la polymérisation entamée, certaines protéines dites de stabilisation peuvent limiter la croissance des filaments d'actine. C'est par exemple le cas de la profiline et la thymosine qui séquestrent les monomères d'actine-G ou encore de la tropomyosine et la tropomoduline (protéines de coiffe) qui recouvrent

les extrémités des filaments. D'autre part, des protéines de fasciculation telles que l' α -actinine ou l'annexine A2 relient les filaments entre eux pour former des faisceaux ou câbles d'actine (*bundles*) (Gabel *et al.*, 2015). Enfin, la dépolymérisation de l'actine-F est facilitée par des protéines de fragmentation des filaments comme la cofiline, la gelsoline ou la scindérine, qui augmentent le recyclage de l'actine en monomères (Pollard, 2016).

3. L'arrimage et la fusion membranaire

Une fois leur destination finale atteinte, les vésicules de transport s'arriment à la membrane pour fusionner avec le compartiment receveur. Parmi les facteurs favorisant l'arrimage à la membrane, on retrouve le complexe de l'exocyste comprenant 8 sous-unités, ainsi que des GTPases de type Rab (Wu et Guo, 2015). La fusion membranaire constitue généralement l'étape limitante des processus de trafic vésiculaire. Durant cette étape, les feuillettes membranaires se faisant face vont adopter des courbures spécifiques. Selon un modèle communément admis, la fusion de deux bicouches lipidiques peut être divisée en trois phases : le contact initial, la formation d'intermédiaires d'hémifusion et l'ouverture d'un pore de fusion (figure 10). Le passage par une étape transitoire d'hémifusion est plus favorable en termes énergétiques que la fusion directe et permet d'expliquer la rapidité des processus de fusion (Jahn *et al.*, 2003). D'une façon générale, chaque intermédiaire de fusion se forme de telle façon que les chaînes d'acides gras ne soient pas exposées à la surface aqueuse. Ainsi, à partir du point de contact initial entre les deux membranes, les feuillettes membranaires proximaux fusionnent en premier pour former une connexion lipidique locale appelée la tige de fusion (*stalk*), alors que les feuillettes distaux restent intacts (Chernomordik et Kozlov, 2008). La formation de cette tige est dépendante de la tension membranaire et nécessite une déformation élastique complexe des feuillettes (McMahon *et al.*, 2010). À partir de cette tige s'effectue ensuite une expansion radiale durant laquelle les feuillettes internes s'écartent et les feuillettes externes se rapprochent pour former un nouveau segment de bicouche, permettant ainsi la formation d'un diaphragme d'hémifusion (Jackson et Chapman, 2008). Enfin, la formation d'un pore de fusion a lieu au sein de ce segment et les phospholipides se faisant face auparavant vont se rejoindre afin de reformer deux bicouches latérales. L'ouverture du pore de fusion et sa croissance dépendent de la tension membranaire, qui est induite par le stress élastique des courbures des deux membranes (Kozlov et Chernomordik, 2015).

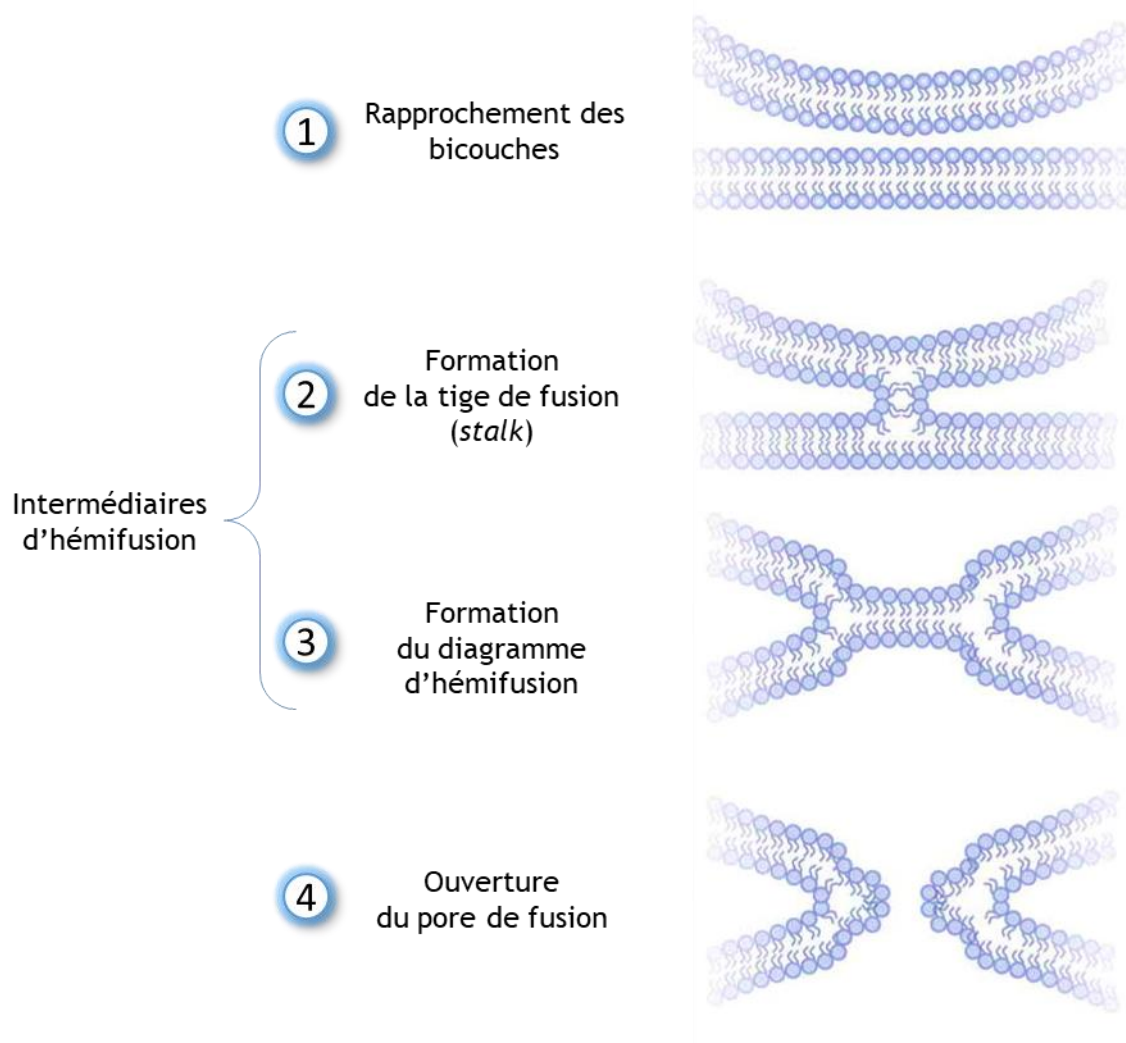


Figure 10 : Les étapes de la fusion membranaire selon le modèle de la tige de fusion
(Adapté de Jackson et Chapman, 2008)

Suite au contact initial, les membranes se rapprochent grâce aux forces exercées par des protéines comme le complexe SNARE. Les feuillettes proximales adoptent ensuite une courbure négative et fusionnent, entraînant la formation d'une tige. Puis ces feuillettes s'écartent et les feuillettes distales s'assemblent en bicouche, produisant le diaphragme d'hémifusion. Enfin, l'induction de courbures positives dans les feuillettes distales permet l'ouverture d'un pore de fusion dans la membrane nouvellement formée.

Depuis plus de quarante ans, de nombreuses études tentent de comprendre comment les composants des membranes peuvent influencer la topologie de celles-ci et combiner leurs actions pour engendrer une déformation conduisant à la fusion membranaire (McMahon et Gallop, 2005). Parmi les acteurs protéiques qui ont été impliqués dans ces processus, le complexe macromoléculaire SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) et ses protéines accessoires jouent un rôle fondamental. De façon générale, la machinerie minimale du complexe SNARE comprend 4 hélices α formées par 3 ou 4 protéines, chacune possédant plusieurs isoformes spécifiques à un compartiment subcellulaire. Dans le cas de l'exocytose, la synaptobrevine ou VAMP (*vesicle-associated membrane protein*) est présente sur les vésicules de transport, tandis que la syntaxine et la SNAP (*synaptosomal-associated protein*)

sont situées sur la membrane plasmique. L'assemblage des hélices de ces protéines en super-hélice joue un rôle important dans l'arrimage des vésicules au compartiment membranaire accepteur et fournit l'énergie nécessaire au rapprochement des membranes (**figure 11**). Par la suite, ce complexe se dissocie, sous l'action par exemple de l'ATPase NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*), ce qui permet son recyclage (Südhof et Rothman, 2009). Bien que ces protéines soient nécessaires à la fusion membranaire, des données expérimentales indiquent clairement que la cinétique de fusion n'est pas seulement liée aux propriétés des protéines SNARE mais dépend également fortement de la composition des bicouches lipidiques. Des modèles réalisés à partir de simulations moléculaires indiquent notamment que ce phénomène de fusion s'accompagne d'événements de remodelage des phospholipides au sein des membranes.

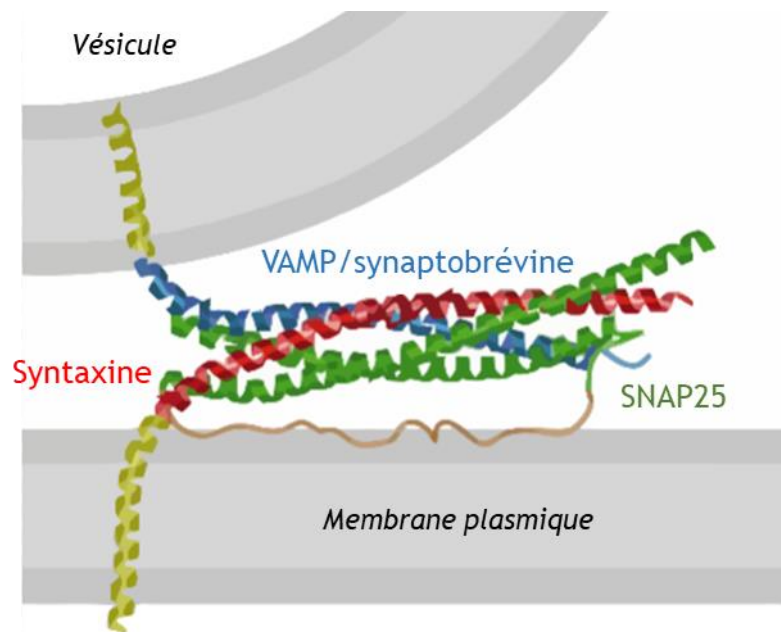


Figure 11 : Exemple de l'organisation structurale du complexe SNARE à la membrane plasmique au niveau de l'élément présynaptique
(Adapté de Sutton *et al.*, 1998)

Le complexe SNARE est formé de trois protéines : la protéine vésiculaire VAMP/synaptobrevine, ainsi que deux protéines situées sur la membrane du compartiment receveur, la syntaxine et SNAP25. L'association des motifs SNARE des trois protéines forme un faisceau de quatre hélices α parallèles qui constitue le cœur du complexe.

C. Le rôle essentiel des lipides membranaires dans le trafic

À ce jour, il existe beaucoup moins d'études qui portent spécifiquement sur la régulation du trafic membranaire par les lipides en comparaison des protéines. Longtemps négligés, notamment en raison des difficultés à les étudier, les lipides apparaissent pourtant aujourd'hui comme des acteurs essentiels durant les différentes étapes du trafic vésiculaire, agissant en synergie avec les acteurs protéiques. Le rôle majeur de certains d'entre eux a été mis en évidence, par exemple au cours de l'exocytose régulée (Tanguy *et al.*, 2016) et la phagocytose (Walpole *et*

al., 2018). J'aborderai plus en détail les fonctions de ces lipides au cours de ces deux processus dans la suite de cette thèse.

1. Hétérogénéité de la composition lipidique à l'échelle cellulaire

La grande diversité des lipides membranaires permet de conférer des propriétés particulières aux différentes membranes cellulaires, afin d'attribuer une fonction spécifique à chaque organite (Bigay et Antonny, 2012). Mais c'est également une façon de leur attribuer une identité propre, afin de faciliter la discrimination d'un compartiment intracellulaire à un autre et de guider le trafic vésiculaire. Ces « cartes d'identité » sont essentiellement définies par les lipides exposés dans le feuillet cytosolique des membranes.

Toutes les membranes des cellules eucaryotes contiennent en grande majorité de la PC, mais aussi de la PE et du cholestérol. Des analyses de lipidomique ont cependant révélé plusieurs gradients de distribution lipidique entre la membrane plasmique et les différents organites impliqués dans le trafic membranaire, leur conférant des propriétés physico-chimiques distinctes (van Meer *et al.*, 2008 ; van Meer et de Kroon, 2011). Le premier de ces gradients concerne le cholestérol, qui est trouvé en abondance dans la membrane plasmique, puis en quantité décroissante dans les citernes de l'appareil de Golgi, jusqu'au REG. De façon similaire, il existe un gradient de charge entre ces différentes membranes, impliquant principalement la quantité de PS dans le feuillet cytosolique. Enfin, le degré d'insaturation des lipides suit également un gradient, mais inversé par rapport aux deux précédents. En effet, les lipides du REG sont généralement plus insaturés que dans l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique. D'une façon générale, cette répartition graduelle fait apparaître deux territoires membranaires : les membranes de la voie de sécrétion précoce (REG et CGN) sont peu chargées et plutôt fluides, tandis que celles de la voie tardive (TGN et membrane plasmique) sont fortement chargées et plus compactes (figure 12).

En parallèle de ces gradients, certains lipides possèdent une localisation spécifique. C'est le cas des PIP, qui sont ainsi considérés comme des marqueurs de compartiments intracellulaires impliqués dans le trafic vésiculaire (Di Paolo et De Camilli, 2006). Les PIP sont formés par phosphorylation du résidu inositol du PI sur des groupements hydroxyles libres, notamment *via* l'activité de PIP kinases. Divers produits peuvent être obtenus en fonction des positions modifiées, dont les plus fréquemment retrouvés sont le PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate), le PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate), le PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) ou encore le PI(3,4,5)P₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). À titre d'exemples, le PI3P se retrouve enrichi plus spécifiquement dans la population des endosomes précoces, alors que le PI4P se concentre dans la membrane de l'appareil de Golgi. La membrane plasmique contient plus particulièrement du PI(4,5)P₂ et du PI(3,4,5)P₃. Une accumulation de PI(4,5)P₂ est notamment observée au niveau des microdomaines lipidiques, dans le feuillet cytosolique (Martin, 2001). D'autres lipides que les PIP sont restreints à un seul type d'organite, comme la cardiolipine (CL),

un lipide uniquement présent dans les membranes mitochondriales où il est synthétisé à partir de PG (Gaspard et McMaster, 2015) ou encore le LBPA (*lysobisphosphatidic acid*) qui est synthétisé exclusivement dans les endosomes (Chevallier *et al.*, 2008).

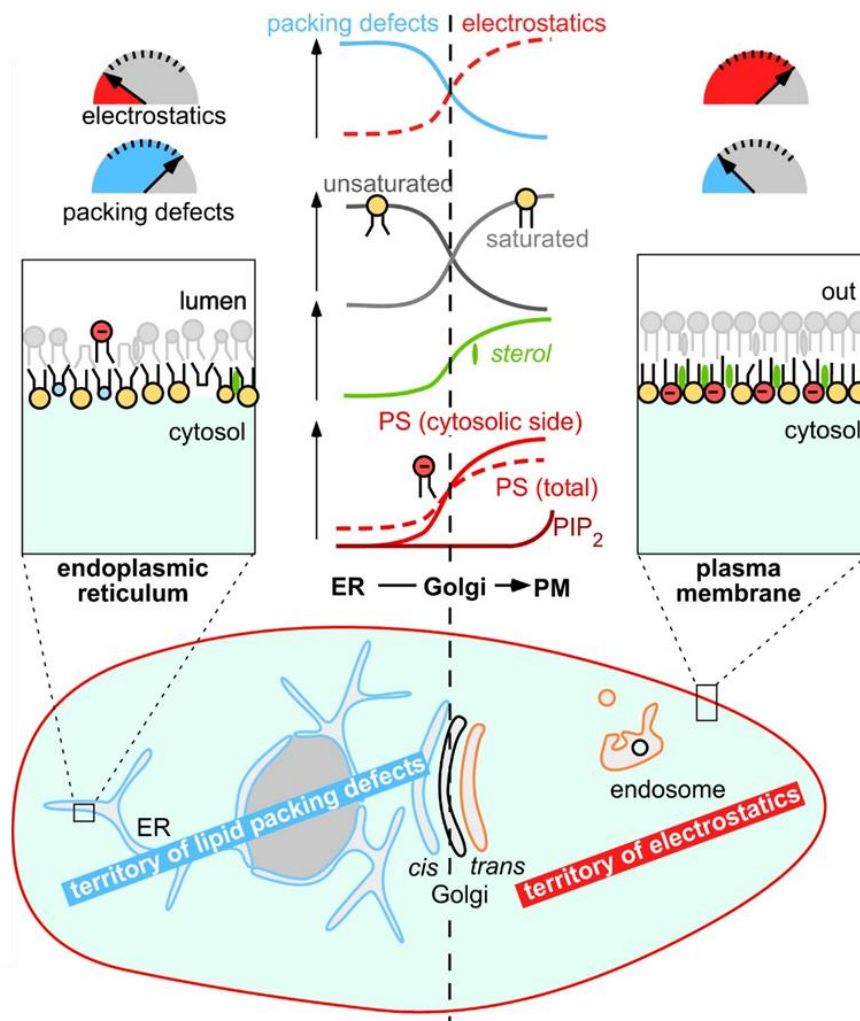


Figure 12 : Diversité de composition lipidique dans les membranes cellulaires
(Bigay et Antony, 2012)

Grâce à une distribution graduelle de certains lipides, deux grands territoires membranaires se distinguent par leurs propriétés physicochimiques. Les membranes du RE et du *cis*-Golgi sont peu chargées négativement et ont une certaine fluidité du fait de leur pauvreté en cholestérol et leur enrichissement en lipides insaturés. À l'inverse, les bicouches du *trans*-Golgi et de la membrane plasmique présentent une charge négative bien plus importante et plus de rigidité, car elles sont riches en lipides saturés et en cholestérol.

2. Les glycérophospholipides, des composés aux multiples rôles

Parmi les lipides membranaires, les glycérophospholipides sont considérés comme des acteurs majeurs des processus d'exocytose et d'endocytose, tout d'abord grâce à leur capacité à moduler la topologie membranaire. Ainsi, en fonction de leur forme tridimensionnelle, ces lipides sont sensés favoriser ou inhiber la déformation membranaire observée au niveau du

compartiment donneur durant la biogenèse des vésicules. De même, certains lipides dits « fusogéniques » semblent faciliter la mise en place des différents intermédiaires de fusion (**figure 13**). En effet, étant donné que l'installation de la tige d'hémifusion requiert des courbures négatives, l'insertion ou la production localisée de lipides coniques dans les feuilletts cytosoliques favoriserait sa formation. À l'inverse, le diagramme d'hémifusion et par conséquent le pore de fusion sont engendrés par des courbures positives, potentialisées en présence de lipides coniques inversés dans les feuilletts distaux (**Chernomordik et Kozlov, 2003**). Une distribution asymétrique en glycérophospholipides entre les deux feuilletts semble ainsi être nécessaire à la fusion membranaire, puisqu'elle contribuerait à la transition entre le stade d'hémifusion et l'étape de fusion complète (**Vicogne et al., 2006**). D'autre part, les glycérophospholipides dits « bioactifs » sont connus pour être formés localement afin de recruter ou activer des protéines impliquées dans le trafic membranaire. Ces lipides, localisés à la fois sur les membranes donneuse et acceptrice, ont le plus souvent des rôles multiples au cours du trafic. Parmi les plus étudiés, on retrouve certains PIP, dont le $PI(4,5)P_2$ qui contrôle le recrutement des protéines motrices sur les vésicules, régule le remodelage du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique et interagit avec la machinerie moléculaire de fusion (**Huijbregts et al., 2000 ; Klopfenstein et al., 2002 ; Di Paolo et De Camilli, 2006**).

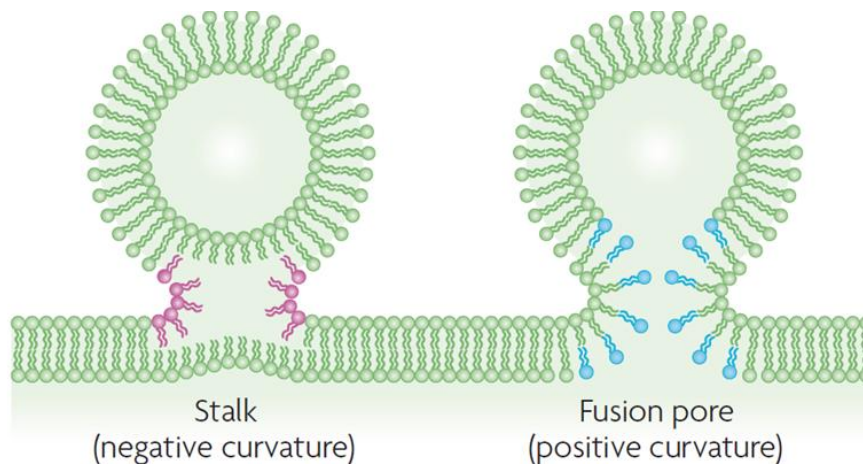


Figure 13 : Modèle de l'influence de la géométrie des phospholipides sur les étapes de la fusion membranaire
(*Piomelli et al., 2007*)

La formation de la tige de fusion (*stalk*) nécessite la présence transitoire d'une courbure négative au niveau des feuilletts proximaux, qui serait favorisée par la génération de phospholipides de forme conique (en rose) tels que le PA, le DAG et la PE. Après le passage par cet intermédiaire, la tige s'élargit pour donner naissance à un pore de fusion. Cette étape finale nécessite à l'inverse la présence d'une courbure positive dans les feuilletts distaux, et serait alors facilitée par l'apparition de lipides coniques inversés (en bleu) comme les lysophospholipides ou les PIP.

Dans la suite de ce chapitre, je me focaliserai sur la formation d'un glycérophospholipide particulier, le PA. Nous verrons que ce lipide présente plusieurs particularités qui en font un bon candidat en tant que régulateur des différentes étapes du trafic membranaire.

III. L'acide phosphatidique (PA)

Le PA représente un très faible pourcentage des phospholipides membranaires, variant d'environ 2 à 6% selon les types cellulaires et les différents organites (Andreyev *et al.*, 2010 ; Shulga *et al.*, 2010). Bien qu'il soit en général présent en quantité limitée dans les membranes, sa formation apparaît pourtant cruciale pour la survie des cellules (Bruntz *et al.*, 2014a). Ce lipide possède en effet des fonctions cellulaires pléiotropiques, qui sont la conséquence directe de sa structure chimique très simple.

A. Propriétés structurales

Le PA ou *1,2-diacyl-sn-glycerol 3-phosphate* constitue l'élément de base des glycérophospholipides, puisque sa tête polaire est formée uniquement d'un phosphate relié par une liaison ester à l'alcool en position *sn-3* du glycérol (**figure 14A**). Un groupement polaire tel que la choline peut être rajouté au PA *via* une liaison phosphodiester, formant *in fine* la majorité des autres phospholipides. Le groupement phosphate formant la tête polaire du PA lui confère une forme géométrique conique, ainsi qu'une ou deux charges négatives en fonction du pH. Cette particularité, ainsi que la proximité de ces charges avec le glycérol, le rendent unique parmi les phospholipides anioniques. Une réduction partielle de la charge du PA, en présence de cations divalents comme le calcium ou en cas d'une acidification du milieu, minimise la répulsion électrostatique entre les têtes polaires. Plusieurs molécules de PA peuvent alors se lier par des ponts hydrogènes intermoléculaires, entraînant la formation de microdomaines enrichis en PA (Demel *et al.*, 1992 ; Garidel *et al.*, 1997). Il semblerait que les propriétés de ces liaisons hydrogènes soient responsables des nombreuses fonctions du PA (Kooijman *et al.*, 2005).

Comme pour tout glycérophospholipide, la partie hydrophobe du PA est formée par un glycérol relié à deux chaînes acyles, qui peuvent varier en longueur ainsi qu'en degré d'insaturation. Chez les mammifères, l'acide gras en position *sn-1* est presque systématiquement saturé et majoritairement sous la forme d'un acide palmitique (C16:0) ou d'un acide stéarique (C18:0). L'acide gras en position *sn-2* peut être saturé, monoinsaturé ou polyinsaturé (jusqu'à 6 insaturations). Des mesures de spectrométrie de masse ont révélé qu'il existait au sein des cellules plus de 40 espèces différentes de PA qui diffèrent par la nature de leurs acides gras (Hodgkin *et al.*, 1998 ; Andreyev *et al.*, 2010 ; Tanguy *et al.*, 2018b, voir en annexe). L'orientation de la tête polaire du PA et l'espace qu'il occupe dans un feuillet membranaire peuvent varier subtilement selon le degré d'insaturation de l'acide gras en position *sn-2* (**figure 14B**). Il est alors important de prendre en considération les différentes espèces de PA impliquées dans un processus donné, car il est possible qu'elles aient une influence non négligeable sur le mode d'action du PA.

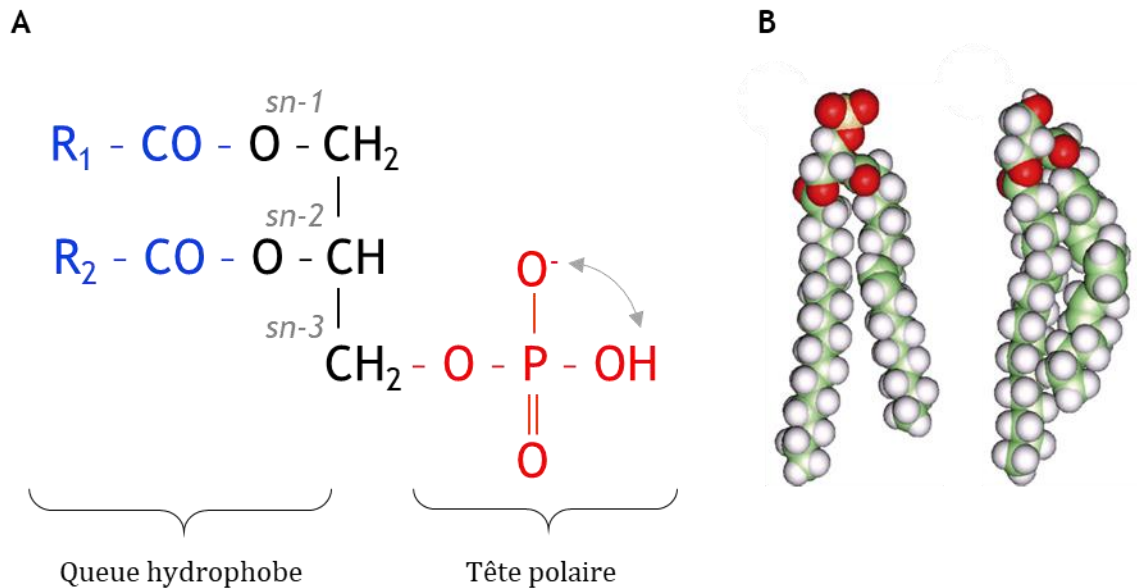


Figure 14 : Structure de l'acide phosphatidique (PA) et importance des chaînes d'acides gras

A) Formule semi-développée du PA

Le PA est formé de deux chaînes d'acides gras, dont les parties hydrocarbonées sont ici représentées par R1 et R2 (en bleu), reliées par une liaison ester à un groupement glycérol, respectivement en position *sn-1* et *sn-2*. Chez les mammifères, la chaîne R1 est un acide gras saturé et la chaîne R2 est le plus souvent insaturée. La position *sn-3* est estérifiée par un phosphate (en rouge), qui forme la tête polaire du PA. Ce lipide anionique présente une charge simple ou double en fonction de son environnement.

B) Modélisation de la géométrie du PA selon le degré d'insaturation de l'acide gras en *sn-2*
(Adapté de Hodgkin et al., 1998)

Les deux espèces de PA illustrées ici contiennent un acide stéarique (C18:0) en position *sn-1*. Par contre, la deuxième chaîne en *sn-2* est un acide gras monoinsaturé (acide oléique, C18:1) pour le PA présenté à gauche et un acide gras polyinsaturé (acide arachidonique, C20:4) pour le PA de droite. La forme tridimensionnelle de ces deux PA est différente, de même que l'orientation de la tête polaire (en rouge).

B. Fonctions cellulaires et partenaires protéiques

Le PA est un acteur central de la biosynthèse des glycérophospholipides et peut ainsi être un intermédiaire dans la formation d'autres lipides structuraux ou bioactifs. De façon plus intéressante, une implication directe du PA a également été observée dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, et ceci pour une grande variété d'organismes. On peut citer son rôle dans la sporulation chez la levure, ses implications multiples dans l'adaptation des végétaux à leur environnement et ses fonctions clés chez les mammifères, entre autres dans le trafic membranaire (Wang et al., 2006). Les propriétés physico-chimiques uniques de ce lipide lui donnent la double capacité de pouvoir non seulement engendrer des courbures membranaires, mais également d'interagir avec des protéines cibles (Stace et Ktistakis, 2006). Il est tout à fait probable que le rôle du PA dans une fonction cellulaire donnée soit dû à une combinaison de plusieurs modes d'action, exercés de façon synergique.

1. Les différents modes d'action du PA

La formation de microdomaines de PA dans un feuillet membranaire peut avoir plusieurs conséquences fonctionnelles (**figure 15**). Tout d'abord, une accumulation locale de PA affecte la topologie membranaire et permet de fournir de la flexibilité dans une bicouche lipidique. En effet, en raison de sa petite tête polaire, le PA présente une forme conique. Il est alors relativement instable au sein d'une membrane plane composée de PC et va avoir tendance à former une courbure membranaire négative lors de sa production (Kooijman *et al.*, 2003). Par conséquent, le PA a été impliqué dans divers processus de trafic intracellulaire durant lesquels des déformations des membranes sont nécessaires et est particulièrement catégorisé comme un lipide fusogénique (Cazzolli *et al.*, 2006). D'autre part, ces microdomaines de PA pourraient induire des changements conformationnels de protéines transmembranaires (Iversen *et al.*, 2015) ou servir de site de recrutement à des « capteurs de courbures membranaires », comme les protéines à domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) (Hirama *et al.*, 2017). Enfin, le PA peut exercer un rôle indirect au sein des cellules en tant que substrat pour la formation d'autres lipides bioactifs comme le diacylglycérol (DAG) (Athenstaedt et Daum, 1999). De façon intéressante, le PA est aussi capable de stimuler directement l'activité de l'enzyme PI4P 5-kinase (PI4P5K), une PIP kinase de type I qui catalyse la production de PI(4,5)P₂ à partir du PI4P (Moritz *et al.*, 1992 ; Jenkins *et al.*, 1994 ; Jones *et al.*, 2000).

Le PA est lui-même un lipide bioactif, car il est capable de recruter et/ou d'activer différentes protéines. L'affinité de ces effecteurs pour le PA est de l'ordre du micromolaire, ce qui est relativement élevé pour une interaction protéine-lipide (Stace et Ktistakis, 2006 ; Kassas *et al.*, 2017). Grâce à des approches de spectroscopie RMN ainsi que de simulation moléculaire, l'équipe de Kooijman a proposé un modèle appelé « *electrostatic-hydrogen bond switch* » pour expliquer ces propriétés (**figure 16**). Selon celui-ci, les protéines sont dans un premier temps recrutées à la membrane *via* une attraction électrostatique, les charges négatives du PA interagissant avec les acides aminés basiques des protéines. Dans un second temps, lorsque ces résidus se trouvent à une distance suffisamment proche du PA (< 3,5 Å), ceux-ci forment une liaison hydrogène avec le groupement phosphate, ce qui induit sa déprotonation et l'amplification de sa charge (de -1 à -2). Il en résulte un verrouillage de la protéine avec le PA qui aboutit *in fine* à une forte fixation (Kooijman et Burger, 2009). De plus, la forme conique du PA entraîne des défauts de compactage des lipides environnants et facilite ainsi l'insertion d'acides aminés hydrophobes dans la membrane (Kooijman *et al.*, 2003 ; Stace et Ktistakis, 2006). Dans de nombreux processus cellulaires, une contribution du PA a été rapportée à travers la modulation de l'association membranaire ou de l'activité de protéines spécifiques (Jenkins et Frohman, 2005).

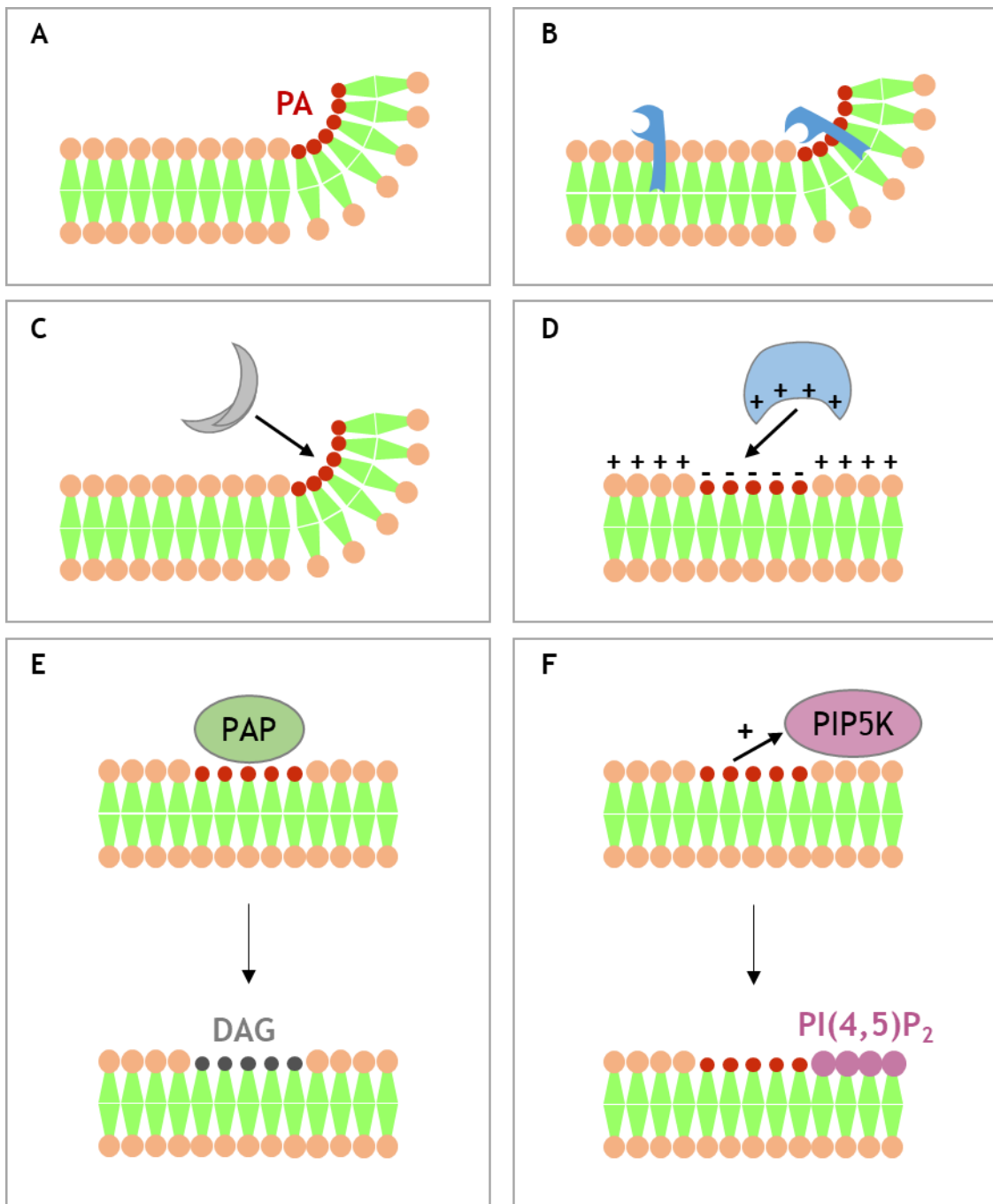


Figure 15 : Les différents modes d'action du PA dans la signalisation cellulaire

Une accumulation locale de PA dans un feuillet membranaire entraîne une courbure négative (A), ce qui peut favoriser les événements de fusion, ainsi qu'induire l'activation de certaines enzymes *via* un changement de leur conformation (B) ou le recrutement de protéines senseurs de courbures (C). La formation de PA peut également permettre de localiser des protéines cibles à un endroit précis de la membrane, *via* des interactions électrostatiques (D). Enfin, le PA formé dans la membrane peut avoir un rôle dans la biosynthèse d'autres lipides bioactifs, en faisant office de substrat pour la formation du DAG par les PA phosphatases (PAP) (E) ou bien en stimulant l'activité de la PI4P 5-kinase (PIP5K), qui produit le phosphoinositide PI(4,5)P₂ (F).

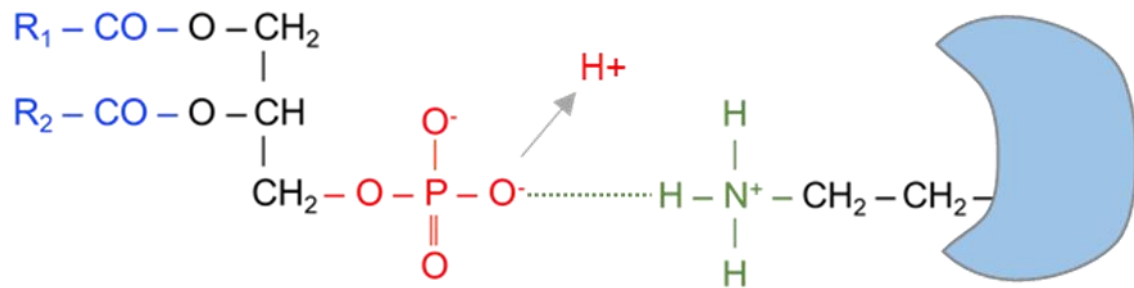


Figure 16 : Représentation de l'interaction entre la tête polaire du PA et la fonction amine primaire d'un résidu basique d'une protéine cible, selon le modèle *electrostatic-hydrogen bond switch*

(Adapté de Kooijman et Burger, 2009)

2. Interaction du PA avec des protéines cibles

Afin de déterminer les mécanismes d'action du PA dans un processus particulier, il est essentiel de rechercher des effecteurs protéiques potentiels. L'affinité d'une protéine pour le PA peut par exemple être testée *in vitro* par des expériences de chromatographie d'affinité réalisées avec du PA greffé sur une résine ou bien à l'aide de membranes de nitrocellulose sur lesquels divers lipides ont été adsorbés (*protein-lipid overlay assay*). Il est plus adapté cependant de rechercher une interaction protéine-lipide dans un contexte membranaire, c'est à dire en utilisant des bicouches de composition lipidique définie reconstituées sous forme de liposomes par exemple ou de membrane supportée (phospholipides en phase fluide, supportés sur une surface solide). La combinaison de ces approches permet de démontrer l'interaction directe d'une protéine avec le PA, de mesurer cette liaison de manière semi-quantitative et de tester sa spécificité par rapport à d'autres lipides chargés négativement. Cependant, il est indispensable que ces essais *in vitro* soient complétés par une approche cellulaire, afin de déterminer la réalité de cette interaction dans un contexte physiologique.

De cette façon, plus de 50 partenaires protéiques du PA ont été décrits dans divers organismes eucaryotes (Jang *et al.*, 2012 ; Bruntz *et al.*, 2014a). Parmi les protéines de mammifères, on retrouve essentiellement des kinases et phosphatases, ainsi que des protéines G et leurs régulateurs (**tableau 2**). Ces cibles sont impliquées dans des voies majeures de signalisation cellulaire, comme les mécanismes de survie et de prolifération, le remaniement du cytosquelette ou encore le stress oxydatif dans les cellules immunitaires. De façon intéressante, une interaction spécifique avec le PA a également été mise en évidence *in vitro* pour des acteurs essentiels des processus de trafic vésiculaire, tels que des GTPases de la famille Arf, l'enzyme NSF impliquée dans la fusion membranaire et la protéine motrice kinésine. Cependant la pertinence physiologique de ces interactions ainsi que les sites de liaison au PA pour ces protéines restent indéterminés (Manifava *et al.*, 2001).

Tableau 2 : Liste non exhaustive de protéines de mammifères interagissant avec le PA
(D'après Bruntz et al., 2014a)

Nom	Rôle du PA	Site de fixation	Référence
Kinases			
Raf1	Recrutement	Résidus 339-423	(Ghosh et al., 2003)
PKCε	Recrutement	Domaine C2	(Corbalán-García et al., 2003)
PKCζ	Activation	Non déterminé	(Limatola et al., 1994)
PKCα	Activation	Non déterminé	(Nakashima, 2002)
PKCδ	Activation	Non déterminé	(Aris et al., 1993)
mTOR	Activation	Domaine FRB (R2109)	(Veverka et al., 2008)
p70S6K1	Activation	Non déterminé	(Lehman et al., 2007)
PI4P5K	Activation	Non déterminé	(Roach et al., 2012)
Fer	Activation	Résidus R417, R425 et H426	(Itoh et al., 2009)
GRK	Activation	Non déterminé	(DeBburman et al., 1995)
Akt	Recrutement	Domaine PH	(Bruntz et al., 2014)
PAK1	Activation	Non déterminé	(Bokoch et al., 1998)
PKN	Activation	Non déterminé	(Morrice et al., 1994)
SPHK1	Recrutement	Région C-terminale	(Delon et al., 2004)
Phosphatases			
SHP1	Activation	Région C-terminale	(Frank et al., 1999)
PP1cy	Inhibition	Résidus 274-299	(Jones et al., 2005)
Lipine 1β	Recrutement	Motif polybasique	(Ren et al., 2010)
Régulateurs des protéines G			
Rac-GDI	Inhibition	Non déterminé	(Chuang et al., 1993)
n-Chimaerine	Activation	Non déterminé	(Ahmed et al., 1993)
NF1	Inhibition	Non déterminé	(Bollag et al., 1991)
ASAP1	Activation	Non déterminé	(Brown et al., 1998)
AGAP1	Activation	Non déterminé	(Nie et al., 2002)
ACAP1/2	Activation	Non déterminé	(Jackson et al., 2000)
ArfGAP1/2	Activation	Non déterminé	(Randazzo, 1997)
RA-RhoGAP	Activation	Résidu R399	(Kurooka et al., 2011)
RGS4	Inhibition	Région N-terminale	(Ouyang et al., 2003)
SOS	Recrutement	Résidus R475 et R479	(Zhao et al., 2007)
DOCK2	Recrutement	Région C-terminale	(Nishikimi et al., 2009)
Phosphodiesterases			
PDE4D3	Activation	Résidus 31-59	(Grange et al., 2000)
PDE4B1	Activation	Non déterminé	(Némoz et al., 1997)
PDE4A5	Activation	Non déterminé	(Némoz et al., 1997)
PDE4A1	Recrutement	Région N-terminale	(Baillie et al., 2002)
Phospholipases C			
PLCβ1	Activation	Résidus Y952 et L955	(Litosch, 2003)
PLCγ1	Activation	Non déterminé	(Jones et al., 1993)
PLCε	Activation	Non déterminé	(Murthy et al., 2006)
PLCδ3	Activation	Non déterminé	(Pawelczyk et al., 1999)
Divers			
NADPH oxydase	Activation	Sous-unité p47 ^{phox}	(Karathanassis et al., 2002)
Neurogranine	Recrutement	Motif IQ	(Domínguez-González et al., 2007)
β-COP	Non déterminé	Non déterminé	(Manifava et al., 2001)
Arf1/6	Non déterminé	Non déterminé	(Manifava et al., 2001)
NSF	Non déterminé	Non déterminé	(Manifava et al., 2001)
Kinésine	Non déterminé	Non déterminé	(Manifava et al., 2001)
Sin1	Recrutement	Domaine PH	(Schroder et al., 2007)
Anc	Non déterminé	Non déterminé	(Epand et al., 2009)
Rac1	Recrutement	Motif polybasique C-terminal	(Chae et al., 2008)

À ce jour, la nature exacte des séquences protéiques qui interagissent avec le PA est encore imprécise. Pour certains de ses partenaires, un domaine de liaison (*PA-binding domain, PABD*) plus ou moins bien défini a été identifié. Un domaine de type PABD se compose généralement d'une courte séquence polypeptidique contenant des groupes de résidus basiques, par exemple arginine ou lysine, ainsi que des résidus hydrophobes (Tanguy *et al.*, 2018a, voir en annexe). Cependant, contrairement à d'autres lipides comme les PIP, il ne semble pas y avoir de séquence consensus entre les différents PABD. De nombreuses cibles du PA présentent également une faible affinité pour d'autres lipides anioniques. On peut ainsi considérer que la liaison PA-protéine soit dépendante en premier lieu d'interactions électrostatiques entre la tête polaire du PA et les résidus basiques des PABD (Kooijman et Burger, 2009). En accord avec ce modèle, des mutations ponctuelles de ces résidus entraînent une diminution de l'affinité pour le PA (Stace et Ktistakis, 2006). Des résidus histidine, sérine et tryptophane sont également fréquemment retrouvés dans les PABD, mais leur fonction n'est pas encore élucidée (Tanguy *et al.*, 2018a). Il est probable que les protéines soient fixées au PA *via* des ponts hydrogènes selon le modèle « *electrostatic-hydrogen bond switch* », puis que cette étape soit suivie d'interactions hydrophobes entre les acides gras du PA et les résidus hydrophobes du PABD, qui stabiliseraient d'autant plus la liaison (Kooijman et Burger, 2009 ; Potocký *et al.*, 2014). Par ailleurs, une étude basée sur une simulation moléculaire a permis de proposer que la protéine de levure Spo20p, dont le PABD a été identifié, est capable de lier jusqu'à 6 molécules de PA simultanément (Potocký *et al.*, 2014).

3. Les sondes moléculaires du PA, des outils pour étudier ses fonctions

À l'heure actuelle, peu d'outils sont disponibles pour l'étude des lipides, en particulier pour le PA, ce qui limite considérablement la compréhension de ses fonctions. La découverte des PABD a été une avancée majeure, car elle a rendu possible depuis une dizaine d'années la création de détecteurs spécifiques du PA. De telles sondes sont extrêmement utiles pour déterminer la localisation de ce phospholipide, mais également pour visualiser sa dynamique de formation et de dégradation dans les cellules vivantes. Elles peuvent ainsi être exprimées dans les cellules par transfection d'un plasmide contenant la séquence d'un PABD couplé à une protéine fluorescente telle que la GFP (*green fluorescent protein*).

Parmi les plus utilisées, on retrouve le PABD provenant de la protéine Spo20p, impliquée dans la sporulation chez la levure et analogue de SNAP25 chez les mammifères. Cette sonde se retrouve principalement localisée dans le noyau des levures et est recrutée à la membrane plasmique durant l'initiation de la sporulation (Nakanishi *et al.*, 2004). Une translocation semblable du PABD de Spo20p a également été observée lors de la croissance des tubes polliniques (Potocký *et al.*, 2014), ainsi que dans des cellules de mammifères en réponse à divers stimuli. L'utilisation de cette sonde au sein de notre équipe a permis de mettre en évidence une formation de PA à la membrane plasmique après stimulation de l'exocytose régulée dans des

cellules neuroendocrines (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007 ; Kassas *et al.*, 2012), ainsi qu'au cours de la formation des neurites dans les neurones en croissance (Ammar *et al.*, 2013). Chez les mammifères, l'oncogène Raf1 fait partie des protéines pouvant être recrutées par le PA et dont le PABD a été identifié (**tableau 2**). Le PABD de Raf1 fusionné à la GFP (Raf-GFP) a également été utilisé dans l'équipe en tant que sonde du PA (Schwarz *et al.*, 2011 ; Kassas *et al.*, 2012). Dans des cellules neuroendocrines PC12 et les macrophages RAW 264.7, la sonde présente une localisation majoritairement cytoplasmique au repos. Suite à la stimulation des cellules, une relocalisation de la sonde à la membrane plasmique a pu être observée, mais de façon bien moins évidente que pour la sonde Spo20p-GFP (Kassas *et al.*, 2012).

Curieusement, différentes sondes du PA adoptent une localisation subcellulaire spécifique (Kassas *et al.*, 2017). Par exemple, le PABD de la protéine Opi1p, un répresseur de la transcription chez la levure, se retrouve au niveau du RE et dans le noyau (Loewen *et al.*, 2004). On peut également citer le PABD de l'enzyme PDE4A1 (*cAMP phosphodiesterase-4A1*), qui se concentre au niveau de l'appareil de Golgi (Baillie *et al.*, 2002 ; Huston *et al.*, 2006). Ceci suggère que les PABD puissent être spécifiques d'un pool de PA et/ou d'un environnement membranaire particulier. L'utilisation de certains PABD a ainsi permis de déterminer les paramètres qui influencent la liaison d'une protéine au PA. Comme mentionné précédemment, bien que cette interaction ne semble pas dépendre d'une séquence peptidique définie, il apparaît cependant clairement qu'elle est affectée par plusieurs paramètres physico-chimiques des membranes. Les données actuelles indiquent ainsi que la courbure membranaire, la composition lipidique locale, la charge du PA et la nature de ses chaînes hydrocarbonées sont autant de facteurs de modulation de l'affinité des PABD (Kassas *et al.*, 2017 ; Tanguy *et al.*, 2018a).

C. Métabolisme du PA

1. Implication du PA dans la biosynthèse des lipides

Le PA est un élément clé dans le métabolisme des lipides. En effet, il sert de substrat dans la formation *de novo* de tous les glycérophospholipides *via* l'ajout d'un groupement polaire sur le phosphate. Il est également le précurseur des lipides de la classe des glycérolipides (ou acylglycérols), qui sont formés par hydrolyse de la liaison ester entre le glycérol et le groupement phosphate. L'un des représentants de cette classe est le DAG, qui a été impliqué dans de nombreux processus cellulaires, en partie par sa capacité à recruter et activer la protéine kinase C (PKC). Non seulement la dégradation du PA permet la synthèse d'autres lipides bioactifs, mais elle contribue aussi potentiellement à la régulation temporelle de l'activité du PA dans un processus cellulaire donné (Athenstaedt et Daum, 1999).

Ainsi, le PA peut être métabolisé par trois familles d'enzymes (**figure 17**). D'une part, il est rapidement converti en DAG par l'activité de phosphatases spécifiques du PA (*phosphatidic acid phosphatases*, PAP) qui hydrolysent la liaison phosphomonoester et laissent ainsi le groupement

glycérol libre (Brindley et Waggoner, 1998). Le DAG formé par cette voie sera ensuite utilisé pour la synthèse de PC, PE et PS, ainsi que des triglycérides (TG). Dans les cellules des mammifères, deux types de PAP ont été identifiés selon leur localisation subcellulaire. Le premier type (PAPI) comprend des enzymes solubles, principalement localisées dans le cytosol et le noyau, et pouvant s'associer aux membranes, alors que le second type (PAPII) se compose d'enzymes transmembranaires, se trouvant majoritairement à la membrane plasmique (Kocsis et Weselake, 1996). Dans le cas des PAPI, trois isoformes sont connues : lipine 1, 2 et 3 (Zhang et Reue, 2017). Le recrutement de la lipine 1 vers les membranes cellulaires semble être régulé par un cycle de phosphorylation/déphosphorylation, mais également par la charge du PA (Grimsey *et al.*, 2008 ; Eaton *et al.*, 2013). D'autre part, le PA peut être métabolisé en cytidine diphosphate-DAG (CDP-DAG) par l'enzyme CDP-DAG synthase (CDS), qui catalyse l'ajout d'une cytidine phosphorylée sur le groupement phosphate. Chez les mammifères, cette enzyme est trouvée principalement dans les microsomes, où le CDP-DAG sera ensuite converti en PI, ainsi que dans la mitochondrie où il est utilisé comme précurseur pour la synthèse du PG et de la CL (Saito *et al.*, 1997). Enfin, le PA peut être également désacylé par les phospholipases A (PLA) de type PLA1 ou PLA2, pour former du LPA (Higgs et Glomset, 1994 ; Thomson et Clark, 1995).

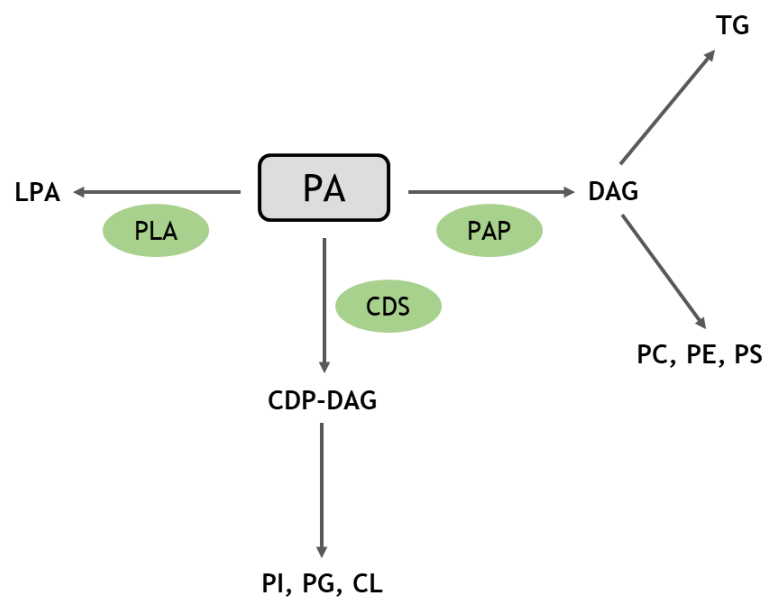


Figure 17 : Le PA, un élément central dans le métabolisme lipidique

Le PA peut être converti en d'autres lipides par trois types d'enzymes. Il peut être hydrolysé en LPA par les PLA. Il peut également servir de substrat à la CDS ou aux différentes PAP afin de former respectivement du CDP-DAG ou du DAG, qui serviront d'intermédiaires dans la synthèse des glycérophospholipides et des acylglycérols.

CDP, cytidine diphosphate ; CDS, CDP-diacylglycérol synthase ; CL, cardiolipine ; DAG, diacylglycérol ; LPA, acide lysophosphatidique ; PA, acide phosphatidique ; PAP, acide phosphatidique phosphatase ; PC, phosphatidylcholine ; PG, phosphatidylglycérol ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PI, phosphatidylinositol ; PLA, phospholipases A1 et A2 ; PS, phosphatidylsérine ; TG, triglycérides.

De façon intéressante, les métabolites directs du PA tels que le LPA et le DAG peuvent à leur tour altérer la topologie membranaire, servir de site d'attachement pour certaines protéines, ou moduler l'activation et la localisation de protéines (Roth, 2008). Le DAG possède une structure très proche de celle du PA, et son absence de tête polaire lui donne une forme conique plus prononcée, pouvant entraîner de fortes courbures négatives au sein d'une membrane. Il peut également interagir avec des effecteurs protéiques comme la PKC, mais avec un mode d'interaction différent de celui du PA au vu de sa charge réduite (Carrasco et Mérida, 2007). Le DAG est plus classiquement formé par l'action de la phospholipase C (PLC) à partir de PI(4,5)P₂. Cependant le DAG produit par la PLC est polyinsaturé en *sn*-2, alors que celui provenant de la déphosphorylation du PA est plutôt saturé ou monoinsaturé. Or, selon sa voie de production, ce lipide semble avoir des rôles distincts (Pettitt *et al.*, 1997). Il est alors probable que les fonctions du DAG dépendent de ses chaînes d'acides gras et que ses effecteurs soient capables de discriminer ce lipide selon son degré d'insaturation. Le LPA quant à lui possède la même tête polaire que le PA, mais une forme géométrique inverse qui favorise une courbure positive. De plus, ce lipide porte une charge négative plus élevée que le PA au sein d'une bicouche de PC, probablement grâce à la présence d'un groupement hydroxyle libre sur le glycérol du LPA (Kooijman *et al.*, 2005). Le LPA intervient notamment dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Moolenaar, 1995). Ces deux métabolites pourront à leur tour être utilisés comme substrat pour reformer du PA. L'interconnexion DAG-PA-LPA permet alors de moduler finement les caractéristiques membranaires selon les besoins de la cellule.

2. Voies de synthèse du PA

Différentes réactions enzymatiques conduisent à la synthèse de PA, selon qu'il soit formé *de novo* (PA structural) ou *via* une transformation d'un autre lipide suite à une activation de voies cellulaires (PA de signalisation) (figure 18).

a. Formation du PA structural

Chez les mammifères, la synthèse *de novo* du PA requiert deux réactions d'acylations successives, en utilisant des acyl-CoA comme donneur d'acyle (Vance et Vance, 2004). La première réaction peut être effectuée *via* deux voies enzymatiques distinctes, ayant pour substrat soit le glycérol-3-phosphate (G3P), soit la dihydroxyacétone phosphate (DHAP). D'une part, l'enzyme G3P acyltransférase (GPAT) catalyse le transfert d'un acide gras sur la position *sn*-1 du glycérol, entraînant ainsi la formation de LPA. D'autre part, l'ajout d'un groupe acyle sur le DHAP par l'enzyme DHAP acyltransférase (DHAP AT) aboutit à la formation de l'intermédiaire 1-acyl-DHAP, qui est ensuite réduit dans une réaction NADPH-dépendante par l'acyl-DHAP réductase (ADR) en LPA. La deuxième réaction d'acylation est alors réalisée par une enzyme de type LPA acyltransférase (LPAAT) sur la position *sn*-2 afin de former le PA.

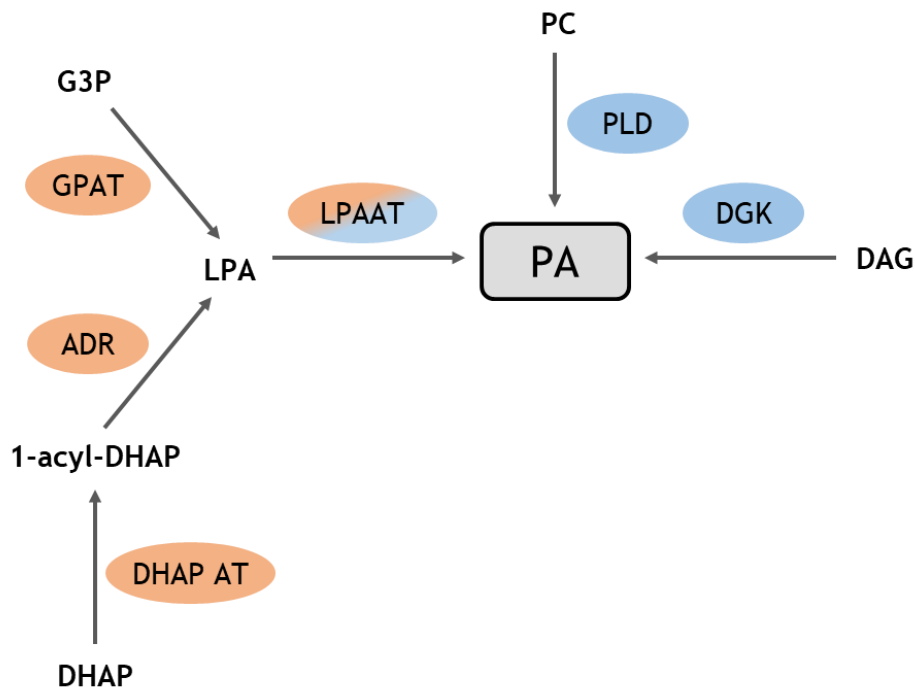


Figure 18 : Voies de biosynthèse du PA

Le PA structural (*de novo*) peut être formé par deux principales voies enzymatiques (en orange), la voie du G3P et celle du DHAP, les deux aboutissant à la formation de l'intermédiaire LPA. La production de PA de signalisation est médiée par 3 types d'enzymes (en bleu) : les LPAAT, les DGK et les PLD.

ADR, acyl-dihydroxyacétone phosphate réductase ; DAG, diacylglycérol ; DGK, diacylglycérol kinase ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; DHAP AT, dihydroxyacétone phosphate acyltransférase ; G3P, glycérol-3-phosphate ; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase ; LPA, acide lysophosphatidique ; LPAAT, acide lysophosphatidique acyltransférase ; PA, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine ; PLD, phospholipase D.

Les différentes acyltransférases impliquées dans ces voies présentent parfois une spécificité de substrat concernant l'acyl-CoA, ainsi qu'une spécificité de localisation subcellulaire. Parmi les quatre isoformes de GPAT identifiées chez les mammifères, les GPAT 1 et 2 sont trouvées dans la membrane mitochondriale externe et utilisent préférentiellement les acyl-CoA saturés (palmitoyl-CoA) par rapport aux insaturés (oléoyl-CoA). En revanche, les GPAT 3 et 4 sont localisées dans la membrane du RE et ne montrent pas de préférence pour les deux types d'acyl-CoA (Wendel *et al.*, 2009). La voie du DHAP quant à elle a lieu principalement dans les peroxysomes, où l'enzyme DHAP AT ajoute un groupe acyle le plus souvent saturé sur le DHAP. Enfin, la dernière réaction d'acylation se produit principalement dans le RE, et le deuxième groupement acyle ajouté par les LPAAT est généralement insaturé (Dircks et Sul, 1999).

Au vu de la place centrale du PA dans la biosynthèse des phospholipides, un défaut dans l'activité de ces acyltransférases a de sérieuses conséquences sur l'organisme (Athenstaedt et Daum, 1999). Chez les procaryotes, où seule la voie G3P est présente, les mutations affectant cette voie s'avèrent létales. Chez les mammifères, un dysfonctionnement de ces enzymes est

responsable de maladies génétiques graves, pouvant atteindre différents organes. On peut citer par exemple le Syndrome de Barth, résultant d'une mutation de l'acyltransférase *Taz1p* et caractérisé notamment par un retard de croissance, une cardiomyopathie, et une neutropénie (Bione *et al.*, 1996).

b. Formation du PA de signalisation

En dehors de la synthèse *de novo*, le PA peut être formé suite à l'activation de voies de signalisation cellulaires. Sa production est alors médiée principalement par trois voies de biosynthèse alternatives. La grande diversité et la complexité de régulation de ces enzymes suggèrent qu'elles soient impliquées dans des fonctions cellulaires spécifiques (Jenkins et Frohman, 2005).

La première voie correspond à l'acylation du LPA par des LPAAT. Chez l'humain, six isoformes de LPAAT ont été identifiées (Coleman et Lee, 2004). Ces isoformes se trouvent principalement dans le RE, ainsi que dans l'appareil de Golgi (LPAAT3) et dans la mitochondrie (LPAAT4 et 5) (Gonzalez-Baro et Coleman, 2017). La LPAAT3 peut affecter la structure des compartiments golgiens et le trafic membranaire par le remodelage des phospholipides (Schmidt et Brown, 2009). D'autres protéines présentant une activité LPAAT ont été impliquées dans le trafic membranaire, en particulier dans la transmission synaptique. C'est le cas de la protéine endophiline I (Schmidt *et al.*, 1999), ou de la protéine RIBEYE dans les synapses à ruban (Schwarz *et al.*, 2011).

La deuxième voie fait intervenir les diacylglycérol kinases (DGK), qui catalysent la phosphorylation du DAG à partir de l'ATP. Chez les mammifères, dix isoformes de DGK (α , β , γ , δ , η , κ , ϵ , ζ , t , θ) ont été clonées et classées en 5 sous-familles selon leurs structures primaires. Toutes les DGK possèdent un domaine catalytique conservé riche en glycine liant l'ATP, ainsi que des domaines spécifiques qui participent à la régulation de l'activité et de la localisation de l'enzyme (Shulga *et al.*, 2011). La moitié des isoformes (α , γ , ζ , t , et θ) sont présentes dans le noyau, où elles semblent jouer des rôles fonctionnels importants sur la prolifération cellulaire (Flores *et al.*, 1996 ; Topham *et al.*, 1998 ; Matsubara *et al.*, 2006). L'isoforme la plus récemment identifiée, DGK κ , est localisée de manière constitutive à la membrane plasmique (Imai *et al.*, 2005) et semble être la cible préférentielle de la protéine FMRP (*fragile-X mental retardation protein*) dont la mutation est responsable du syndrome de l'X fragile (Tabet *et al.*, 2016). Les DGK ont également été trouvées au niveau d'autres compartiments membranaires, tels que le RE (ϵ et δ), l'appareil de Golgi (γ) ou encore les endosomes (δ et η) (Kobayashi *et al.*, 2007). Par ailleurs, des études ont révélé l'association de l'isoforme β avec les filaments d'actine, ainsi qu'un rôle de l'isoforme ζ dans la dynamique du cytosquelette d'actine *via* son interaction avec des protéines régulatrices (Abramovici *et al.*, 2009). En plus des différentes DGK citées ci-dessus, la protéine *PKR-like ER*

kinase (PERK) possède une activité lipide-kinase intrinsèque au niveau du RE, et utilise le DAG comme substrat préférentiel (Bobrovnikova-Marjon *et al.*, 2012).

L'activation des DGK est soumise à une régulation complexe, qui nécessite généralement leur arrivée à un compartiment membranaire. La plupart des isoformes nucléaires peuvent parvenir à la membrane plasmique suite à l'activation de voies de signalisation spécifiques. Par exemple, l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) conduit à la translocation des DGK ζ et θ à la membrane plasmique, suite à leur phosphorylation par la PKC (Santos *et al.*, 2002 ; Sanjuán *et al.*, 2003 ; van Baal *et al.*, 2005). Le niveau de phosphorylation des DGK semble donc représenter un des éléments majeurs du contrôle de leur localisation et de leur activité. Une fois associées aux membranes, l'activité des DGK peut être régulée par divers cofacteurs comme le calcium ou certains lipides tels que les PIP (PI3P, PI(4,5)P₂, PIP₃), la PS et la sphingosine (Shulga *et al.*, 2011). Le recrutement des DGK permet de moduler finement la balance DAG/PA au sein d'une membrane, et d'influencer par conséquent les fonctions cellulaires régulées par ces deux lipides.

L'activité des DGK joue un rôle important dans le trafic vésiculaire, notamment dans la neurotransmission. Les isoformes β , γ , et θ sont notamment exprimées de façon prépondérante dans le système nerveux. Un modèle de souris invalidées pour la DGK β présente une anomalie de formation des épines dendritiques des neurones de l'hippocampe, associée à une déficience de mémorisation spatiale (Shirai *et al.*, 2010). Plus récemment, le groupe de Daniel Raben a montré que l'isoforme DGK θ s'associe à la membrane présynaptique de neurones murins et participe au recyclage des vésicules synaptiques (Goldschmidt *et al.*, 2016). Par ailleurs, un défaut d'expression de la DGK κ a été associé aux anomalies synaptiques et comportementales observées chez les souris *Fmr1* KO (*knock out*), un modèle du syndrome de l'X fragile. La surexpression de cette isoforme dans les neurones *Fmr1* KO permet de restaurer la densité et la morphologie des épines dendritiques (Tabet *et al.*, 2016).

La dernière voie de production du PA est médiée par l'activité des phospholipases D (PLD), qui possèdent une capacité de remodelage de la bicouche lipidique en hydrolysant majoritairement la PC. Cette voie de synthèse du PA est beaucoup plus rapide et régulée que les autres voies, ce qui suggère qu'elle soit la principale source de PA nécessaire à des phénomènes tels que les processus d'exocytose et d'endocytose. Dans la dernière partie de cette introduction, je vais présenter les caractéristiques de ces enzymes et détailler leurs fonctions.

IV. Les phospholipases D (PLD)

Les PLD sont des enzymes membranaires de la superfamille des phospholipases. Ces enzymes forment le PA en catalysant l'hydrolyse de la liaison ester entre le phosphate et le groupement polaire des phospholipides (liaison phosphodiester distale). Cette activité catalytique est extrêmement conservée au cours de l'évolution, ce qui suggère qu'elle est associée à des fonctions cellulaires essentielles à tout être vivant (Selvy *et al.*, 2011).

A. Identification des PLD, des végétaux aux mammifères

1. Des premières découvertes à la caractérisation des enzymes

Une activité de type PLD a été décrite pour la première fois à la fin des années 1940 chez les plantes, dans des extraits de carottes, puis de feuilles de chou (Hanahan et Chaikoff, 1947, 1948). Ces extraits végétaux présentant une activité PLD importante, ils furent ensuite utilisés comme biocatalyseur dans la synthèse de nouveaux phospholipides (Long *et al.*, 1967 ; Eibl et Kovatchev, 1981). Il faudra attendre les années 1990 pour obtenir la première purification de l'enzyme à partir d'extraits de chou, étape nécessaire à la caractérisation des PLD par la suite (Abousalham *et al.*, 1993). Les isoformes issues des plantes (PLD α , PLD β , et PLD γ) ont été les premières purifiées, clonées et caractérisées (Wang *et al.*, 1994). Ces travaux ont ainsi été les prémices de la caractérisation des PLD dans une grande variété d'organismes, tels que les bactéries (Iwasaki *et al.*, 1994), les levures (Waksman *et al.*, 1996), les virus (Zhao *et al.*, 1997), et enfin les mammifères (Meier *et al.*, 1999).

Les PLD de plusieurs espèces procaryotes et eucaryotes ont ainsi été clonées, et la comparaison des séquences entre différents règnes a permis de mettre en évidence des régions et motifs très conservés ainsi que des domaines de régulation. Par la suite, les membres de la famille des PLD ont été séparés en deux groupes distincts. Le premier groupe est constitué d'enzymes à activité PLD mais non homologues, présentant des domaines catalytiques différents. Cette catégorie comporte ainsi plusieurs types de PLD provenant d'organismes eucaryotes et procaryotes, qui jouent tout de même des rôles biologiques importants chez les mammifères et sont généralement sécrétés comme facteurs de virulence chez les bactéries. Le second groupe de PLD, majoritaire, comprend des enzymes présentant une homologie de séquence et notamment le motif HxKx₄D (motif HKD) conservé chez toutes les espèces, contenant les résidus chargés histidine (H), lysine (K) et aspartate (D) (x étant un acide aminé quelconque). Ce motif, généralement dupliqué, est situé au niveau du centre catalytique (Hammond *et al.*, 1995). Ce second groupe est donc nommé « à séquence consensus HKD », à l'inverse du premier groupe « non-HKD » (Selvy *et al.*, 2011).

2. Les différentes PLD chez les mammifères

Bien que les PLD aient été identifiées tardivement dans le règne animal, les PLD de mammifères ont très vite fait l'objet d'un vif intérêt. Les travaux portant sur l'identification, la purification, l'isolement des PLD et la détermination de leurs mécanismes d'action se sont alors succédé. La première activité PLD de mammifère a été découverte au milieu des années 1970 dans des extraits membranaires de cerveau de rat (Saito et Kanfer, 1973, 1975). Kanfer et ses collègues ont partiellement solubilisé une PLD d'environ 200 kDa, dont l'activité est optimale à pH 6, et est stimulée par l'oléate de sodium. Ce n'est qu'à la fin des années 1980 que cette activité PLD a été impliquée dans la transduction du signal suite à la fixation d'agonistes sur leurs récepteurs membranaires (Billah *et al.*, 1989). Par la suite, diverses études chez le rat ont rapporté la présence de deux PLD au niveau du cerveau : l'une activable par des petites GTPases (de type Arf ou Rho) et dépendante du PI(4,5)P₂, et l'autre activable par l'oléate de sodium mais non stimulée en présence de PI(4,5)P₂ ou de GTPases (Massenburg *et al.*, 1994). Ces études ont ainsi permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs isoformes de PLD ayant des mécanismes de régulation distincts.

La caractérisation des PLD a ensuite permis l'identification par homologie de séquence de six isoformes (PLD1-6) possédant une séquence consensus HKD. Le rôle des différents domaines structuraux qui composent ces enzymes seront décrits dans la suite de cette introduction. Les isoformes PLD1 et PLD2, découvertes à la fin des années 1990, restent les isoformes les mieux caractérisées à ce jour (**figure 19**).

Le premier clonage de la PLD1 humaine (hPLD1) a été réalisé par le groupe de Michael Frohman, à partir d'une banque d'ADN complémentaire de cellules HeLa (Hammond *et al.*, 1995). Leurs travaux ont montré que le gène de la hPLD1 code pour une protéine de 1074 acides aminés, correspondant à une masse moléculaire d'environ 120 kDa. Le même groupe montrera deux ans plus tard la coexistence de deux variants d'épissage, le variant PLD1b comportant une délétion de 38 acides aminés (résidus 585 à 624) par rapport à PLD1a (Hammond *et al.*, 1997). Ces deux variants présentent une structure quasi identique, ainsi que des propriétés catalytiques similaires. Après le clonage de la hPLD1, d'autres séquences homologues ont été identifiées chez les mammifères (Ribbes *et al.*, 1996). Les variants PLD1a et PLD1b ont notamment été retrouvés par la suite dans plusieurs tissus chez le rat (Katayama *et al.*, 1998) et chez la souris (Colley *et al.*, 1997a).

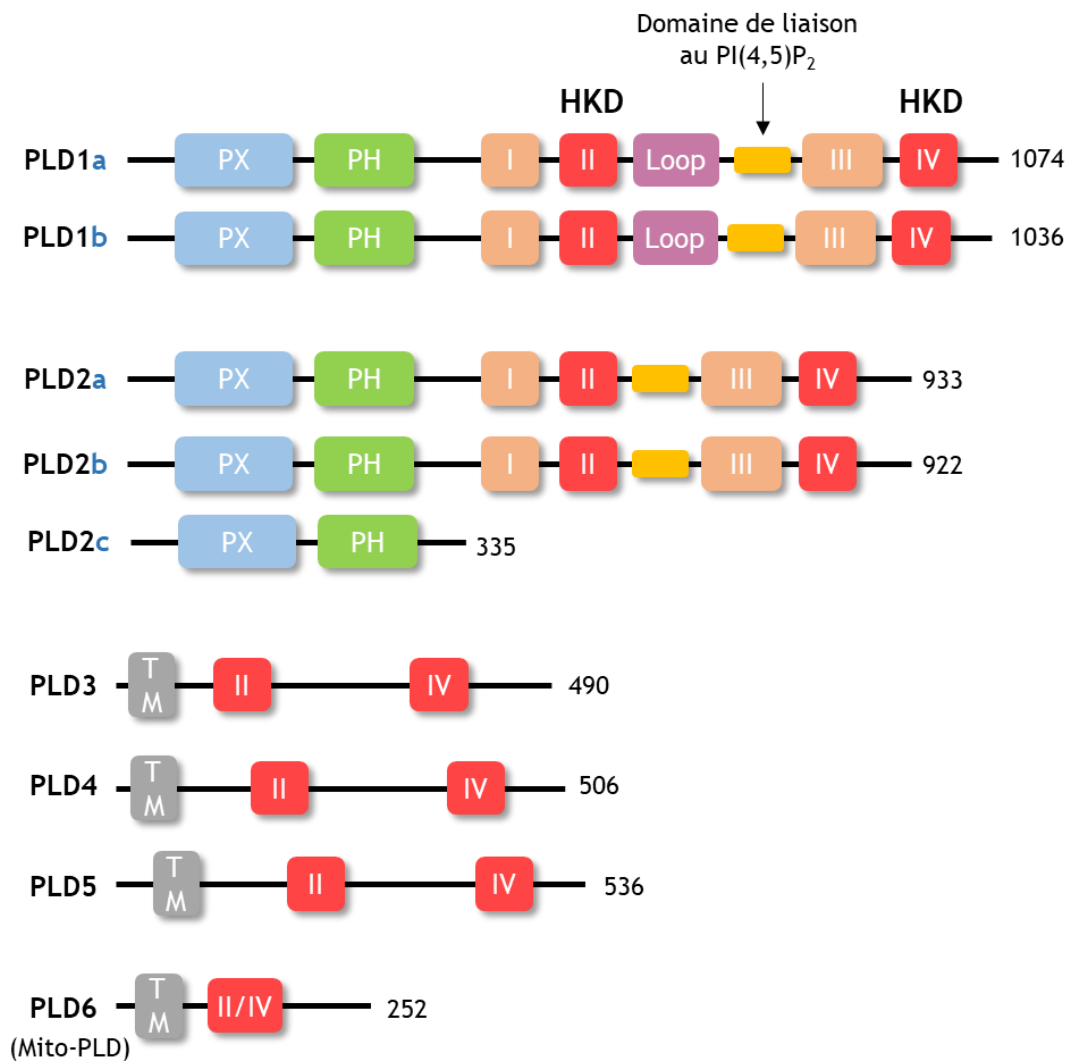


Figure 19 : Structure des isoformes des PLD à séquence consensus HKD identifiées chez les mammifères

(Adapté de Kanaho *et al.*, 2009 ; Egea-Jimenez et Zimmermann, 2018)

Les domaines sont représentés de l'extrémité N-ter (à gauche) à l'extrémité C-ter (à droite). Les chiffres à droite des séquences indiquent le nombre d'acides aminés composant chaque protéine. Les PLD1-6 possèdent toutes au moins un domaine HKD. La PLD1 possède deux variants d'épissage PLD1a et PLD1b de structure extrêmement similaire. La PLD2 quant à elle est connue sous la forme de trois variants : PLD2a et PLD2b, qui sont quasiment identiques, et la forme tronquée PLD2c. Les 4 isoformes PLD3-6 comportent une hélice transmembranaire (TM) en N-ter.

Un second gène codant une protéine de structure très proche de la PLD1 a ensuite été identifié chez la souris (Colley *et al.*, 1997b) puis chez l'homme (Lopez *et al.*, 1998), et sa séquence complète a été décrite. Ce gène code pour une protéine de 933 acides aminés appelée par la suite PLD2, d'une masse moléculaire d'environ 100 kDa, et présentant environ 50% d'homologie de séquence avec PLD1. Les PLD1 et PLD2 peuvent différer notamment au niveau de leurs régions carboxy-terminale (C-ter) et amino-terminale (N-ter), qui comportent des domaines responsables de leur régulation et leur localisation. De plus, la PLD2 est déletée d'une boucle centrale de 116

acides aminés (résidus 505-620) présente au milieu de la séquence de la PLD1 (Frohman *et al.*, 1999). Trois variants d'épissage de la PLD2 humaine ont été séquencés à ce jour, dont le plus long est hPLD2a, le variant hPLD2b étant plus court de 11 acides aminés (résidus 810-820). Le variant hPLD2c est une forme tronquée et inactive dont la fonction est inconnue. Il ne comprend pas de site catalytique mais seulement les 335 premiers acides aminés de la séquence hPLD2a (Steed *et al.*, 1998).

Les quatre autres isoformes des PLD ont été découvertes plus récemment et restent peu caractérisées. Une activité de type PLD a tout d'abord été détectée spécifiquement dans la mitochondrie, où elle facilite les événements de fusion mitochondriale. L'isoforme identifiée, appelée Mito-PLD (puis PLD6), présente une homologie de séquence avec une PLD bactérienne, l'endonucléase Nuc, qui hydrolyse la liaison phosphodiester du squelette nucléique de manière analogue aux phospholipides. La PLD6 est homodimérique et contient ainsi deux hélices transmembranaires responsables de son insertion sur la membrane externe de la mitochondrie (Choi *et al.*, 2006). Cette isoforme hydrolyse spécifiquement la CL pour former du PA. Concernant les PLD3-5, elles ont été identifiées uniquement par homologie de séquence et aucune activité catalytique n'a été détectée à ce jour pour ces isoformes. Les PLD3 et PLD4 présentent une activité exonucléase et peuvent s'ancrer dans la membrane du RE *via* une hélice transmembranaire qui place leurs domaines catalytiques à l'intérieur des citernes (Gavin *et al.*, 2018). La PLD3 semble impliquée dans la formation des fibres musculaires (Osisami *et al.*, 2012). Bien que controversées, différentes études ont également révélé l'existence d'une prédisposition à la maladie d'Alzheimer pour certains variants de la PLD3 (Cruchaga *et al.*, 2014). La PLD4, quant à elle, a été impliquée dans la phagocytose chez les cellules microgliales, où elle a été détectée au niveau du noyau et des phagosomes (Otani *et al.*, 2011). Le gène de la PLD4 a été identifié dernièrement comme un facteur de susceptibilité du développement de maladies auto-immunes (Okada *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2017 ; Akizuki *et al.*, 2019), mais le mécanisme d'action mis en œuvre reste non identifié. Pour finir, la PLD5 présente également une hélice transmembranaire mais aucune conservation du site catalytique, et sa localisation ainsi que sa fonction sont encore inconnues (Frohman, 2015).

Outre les PLD1-6, d'autres enzymes de type PLD mais dépourvues de séquence HKD ont été identifiées. On peut citer par exemple la GPI-PLD, qui hydrolyse le glycolipide GPI en générant une molécule de PA, permettant de libérer l'ancre GPI de certaines protéines associées aux membranes cellulaires (Scallan *et al.*, 1991). La N-acyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE)-PLD, quant à elle, hydrolyse la NAPE afin de générer une molécule de PA et libérer de la N-acyléthanolamine. Cette enzyme joue un rôle important dans la synthèse des endocannabinoïdes (Okamoto *et al.*, 2004). Enfin, l'autotaxine (ATX) est une lyso-PLD sécrétée qui hydrolyse les lysophospholipides telle la LPC (lysophosphatidylcholine) afin de produire du LPA, un lipide stimulant la prolifération cellulaire (Hausmann *et al.*, 2011).

La suite de cette introduction se focalisera sur les PLD des mammifères comportant la séquence consensus HKD, notamment les isoformes PLD1 et PLD2.

B. Caractéristiques enzymatiques des PLD

1. Activité enzymatique

a. Les phospholipases cellulaires

Les phospholipases sont une classe d'enzymes capables d'hydrolyser les phospholipides membranaires. Elles assurent ainsi un remodelage dynamique des membranes, et sont également responsables de la production de médiateurs lipidiques (Darios *et al.*, 2007). Il existe quatre types majeurs de phospholipases cellulaires : la PLA1 (EC 3.1.1.32), la PLA2 (EC 3.1.1.4), la PLC (EC 3.1.4.3) et la PLD (EC 3.1.4.4). Ces différents types possèdent une spécificité de lyse d'une liaison ester au sein du phospholipide (**figure 20**).

Les PLA1 et PLA2 hydrolysent la liaison ester des glycérophospholipides en position *sn-1* et *sn-2* respectivement. Elles produisent ainsi un lysophospholipide membranaire et libèrent un acide gras soluble dans le cytosol. Ces deux enzymes sont responsables de la conversion du PA en LPA, mais également de la production d'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé de type oméga-6. Cet acide gras pourra ensuite servir de précurseur à des médiateurs de type eicosanoïdes jouant un rôle important dans l'inflammation ou l'agrégation plaquettaire (Aoki *et al.*, 2008 ; Dennis *et al.*, 2011).

La PLC, quant à elle, hydrolyse la liaison phosphodiester proximale des glycérophospholipides, située en position *sn-3*. Cette enzyme génère alors une molécule de DAG qui reste ancrée dans la membrane et libère le groupement polaire lié au glycérol. Les PAP ont une activité enzymatique similaire mais PA-spécifique. *In vivo*, les PLC catalysent l'hydrolyse du PI(4,5)P₂, le plus souvent suite à l'activation de récepteurs membranaires, et libèrent ainsi une molécule d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Le DAG et l'IP₃ sont des seconds messagers importants qui contrôlent diverses voies de signalisation cellulaire. Le DAG néosynthétisé va pouvoir agir sur la courbure membranaire ainsi qu'activer la PKC, tandis que l'IP₃ provoque une augmentation de la concentration cytosolique de calcium à partir des réserves du RE (Nakamura *et Fukami*, 2017).

Enfin, la PLD hydrolyse la liaison phosphodiester distale des phospholipides membranaires. Son action permet ainsi de produire une molécule de PA dans la membrane en libérant dans le cytosol la tête polaire du phospholipide substrat. Les différentes PLD prennent principalement la PC comme substrat, mais elles peuvent également utiliser la PE, le PI ou la CL.

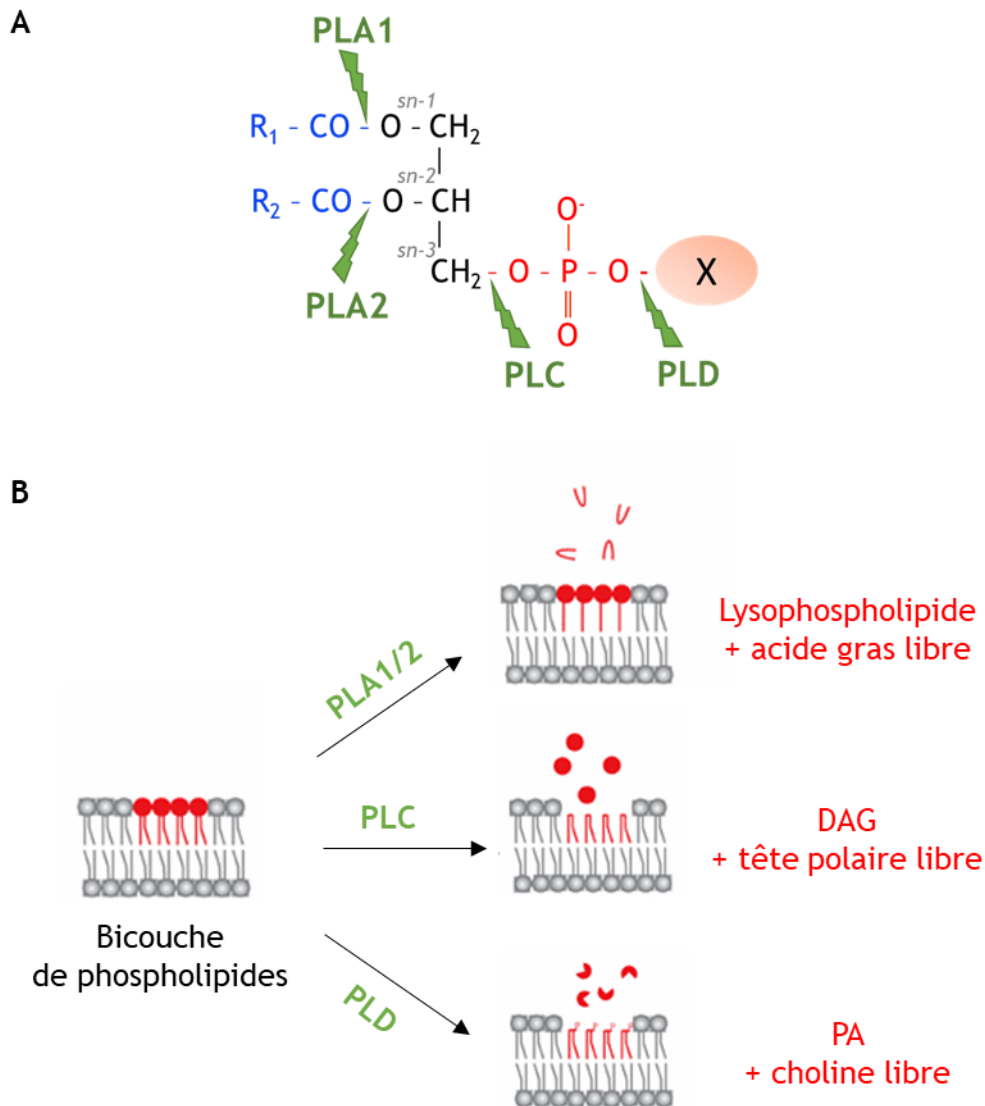


Figure 20 : Réactions enzymatiques catalysées par les différentes phospholipases

A) Sites d'hydrolyse spécifiques des phospholipases

Chacune des phospholipases clive une liaison ester distincte sur le phospholipide. Les PLA1 et PLA2 hydrolysent la liaison en position *sn-1* et *sn-2*, respectivement. La PLC quant à elle hydrolyse la liaison proximale en position *sn-3*, et la PLD la liaison distale.

B) Production des lipides de signalisation

(Adapté de *Darios et al., 2007*)

L'activité des PLA génère des lysophospholipides ainsi que des acides gras libres. La PLC est responsable de la production de DAG en libérant le groupement polaire phosphoré. Enfin, la PLD produit du PA et de la choline libre dans le cas majoritaire où l'enzyme utilise la PC comme substrat.

b. Réactions enzymatiques catalysées par les PLD

En condition physiologique, c'est-à-dire en milieu aqueux, les PLD catalysent l'hydrolyse des phospholipides *via* le transfert d'une molécule d'eau à la place du groupement polaire lié au phosphate. Les PLD des mammifères hydrolysent principalement la PC et produisent ainsi du PA dans le feuillet cytosolique de la bicoche, ainsi qu'un produit soluble, la choline (*Exton, 2000*).

Cette activité a été décrite dans des cellules de mammifères en 1975, plus de 30 ans après la première découverte des PLD chez les végétaux. La choline étant une molécule très abondante dans divers tissus et ne possédant pas de rôle de second messager, il est supposé que la fonction de la PLD soit essentiellement médiée par la formation du PA. De façon intéressante, la conversion de la PC en PA permet la formation d'un lipide conique chargé négativement à partir d'un lipide cylindrique neutre, ce qui modifie les propriétés de la membrane au niveau du site d'activité de la PLD en entraînant notamment l'apparition d'une courbure négative (**figure 21A**).

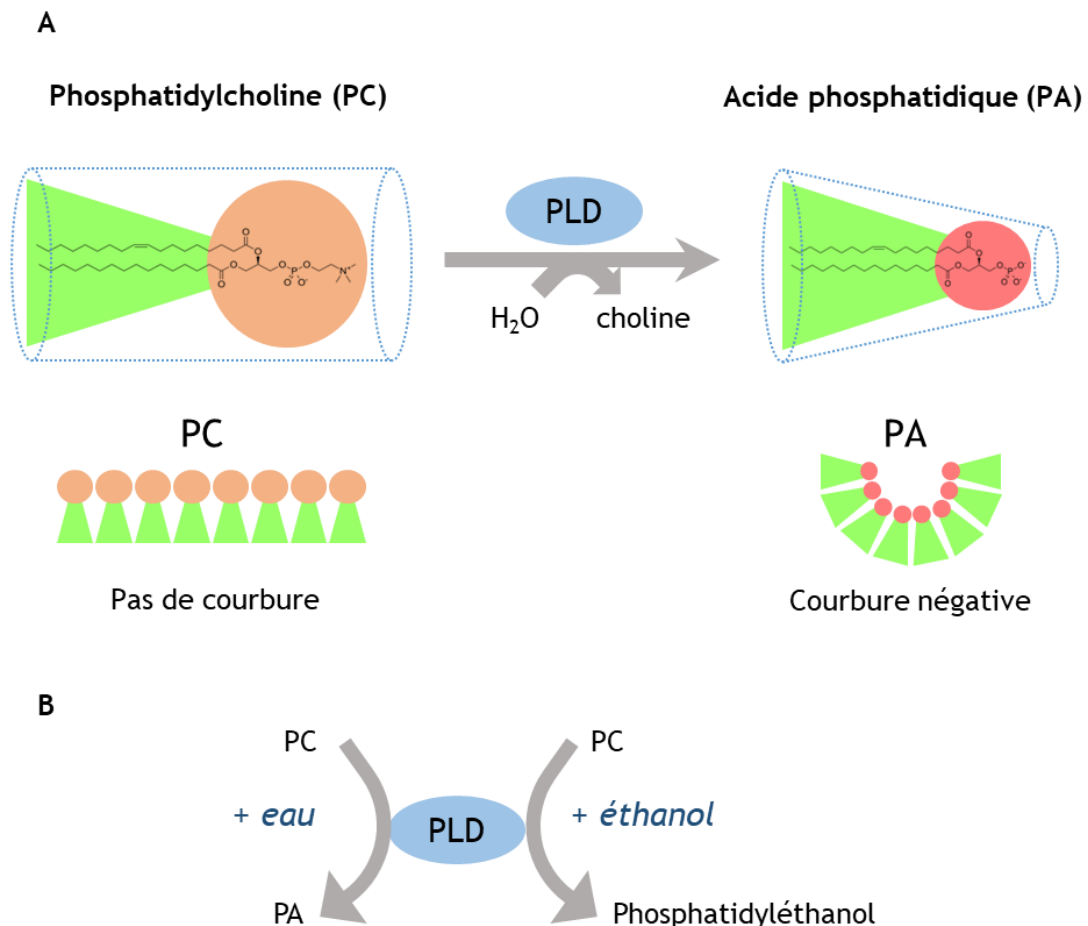


Figure 21 : Réactions enzymatiques catalysées par la PLD

A) Formation du PA par la PLD

En conditions physiologiques, la PLD produit du PA en hydrolysant la liaison phosphodiester distale des glycérophospholipides, avec pour substrat préférentiel la phosphatidylcholine. Cette activité enzymatique spécifique transforme un lipide cylindrique en un lipide conique, dont l'accumulation va créer une courbure négative du feuillet membranaire.

B) Activité de transphosphatidylation en présence d'alcool primaire

En présence d'une faible concentration d'alcools primaires à courte chaîne comme l'éthanol ou le butanol, la PLD catalyse la formation de phosphatidylalcool aux dépens du PA. Cette activité de transphosphatidylation est utilisée comme moyen d'inhiber les fonctions physiologiques des PLD.

En plus de la réaction d'hydrolyse, les PLD peuvent également réaliser une transphosphatidylation, qui consiste en l'échange de la tête polaire du phospholipide substrat par

une autre tête polaire (**figure 21B**). Cette réaction est réalisée en présence d'alcools primaires à chaîne courte, qui sont alors utilisés à la place de l'eau pour cliver la liaison phosphodiester distale, conduisant à la formation du phosphatidylalcool correspondant. Les alcools primaires sont d'excellents accepteurs nucléophiles, possédant une réactivité 1000 fois plus élevée que l'eau. En présence d'une faible concentration d'alcool primaire, on observe donc une formation préférentielle de phosphatidylalcool aux dépens du PA (Yang *et al.*, 1967). Il a été montré que la PLD de membranes de cerveau de rat utilise de manière plus efficace le 1-butanol par rapport au propanol et à l'éthanol (Chalifa-Caspi *et al.*, 1998). Cette réaction a été considérablement utilisée en tant que marqueur de l'activité PLD, mais aussi comme un moyen d'inhiber l'activité de ces enzymes en court-circuitant la formation du PA.

Les PLD1 et PLD2 présentent toutes deux une activité d'hydrolyse et de transphosphatidylatation PC-spécifique. Elles partagent également une forte dépendance au PI(4,5)P₂, la présence de ce phosphoinositide étant nécessaire à leur activité. Cependant, la PLD2 possède *in vitro* une activité basale jusqu'à 1500 fois supérieure à celle de la PLD1. Cette activité est considérée historiquement comme peu voire non stimulée par les protéines activatrices de la PLD1 (Frohman *et al.*, 1999), bien que ceci soit remis en question par des observations plus récentes (Ghossoub *et al.*, 2014).

c. Mécanisme catalytique

Les PLD1 et PLD2 sont composées de deux domaines HKD, qui sont sollicités pour la réaction de transphosphatidylatation ou d'hydrolyse. L'analyse d'une série de mutations réalisées dans ces domaines a ensuite permis une meilleure compréhension du mécanisme catalytique de ces enzymes. Ces observations ont permis d'établir un modèle de catalyse théorique mettant en jeu un mécanisme en deux temps de type « ping-pong », car il fait successivement intervenir les deux domaines catalytiques (Sung *et al.*, 1997). Bien que la formation d'un intermédiaire phosphatidyl-enzyme au cours de la réaction de transphosphatidylatation ait été mise en évidence très tôt après la découverte des PLD (Yang *et al.*, 1967), le mécanisme catalytique n'a pu être étudié que récemment. La structure tridimensionnelle d'une PLD cristallisée en présence de son substrat a été obtenue pour la première fois chez la bactérie *Streptomyces*. L'observation de cette structure a confirmé le mécanisme d'action de type « ping-pong », et a également montré que les résidus histidines des deux domaines HKD permettent de coordonner directement la réaction (Leiros *et al.*, 2000). L'implication des différents résidus du motif catalytique HKD a également été étudiée *in silico* par la modélisation moléculaire dynamique de 19 résidus composant le site actif (DeYonker et Webster, 2013).

L'ensemble de ces études a permis de distinguer 4 étapes successives dans le mécanisme catalytique des PLD1 et PLD2 (**figure 22**). Après l'adsorption de la PLD à l'interface lipidique, le groupement amine de l'histidine du domaine HKD 1 se lie au phosphate de la PC. Cette 1^{ère} étape

réactionnelle conduit à la formation d'une liaison phosphoramidate entre la PLD et la PC, générant ainsi un intermédiaire covalent PLD-PC. La liaison phosphodiester distale de la PC est ensuite clivée par l'attaque nucléophile de l'histidine du domaine HKD 2. Cette 2^{ème} étape permet de libérer la choline et de former un intermédiaire phosphatidyl-PLD. Le nucléophile (molécule d'eau ou d'alcool primaire) est ensuite pris en charge par la PLD, puis le résidu histidine du domaine HKD 2 réalise une oxydation de celui-ci. Cette 3^{ème} étape induit le transfert du second substrat oxydé sur le groupement phosphate libre, afin de former un intermédiaire PLD-phosphatidylalcool ou PLD-PA. La dernière étape de rupture de la liaison phosphoramidate instable aboutit à la libération du PA ou du phosphatidylalcool néosynthétisé, ainsi qu'à la régénération du site catalytique de la PLD.

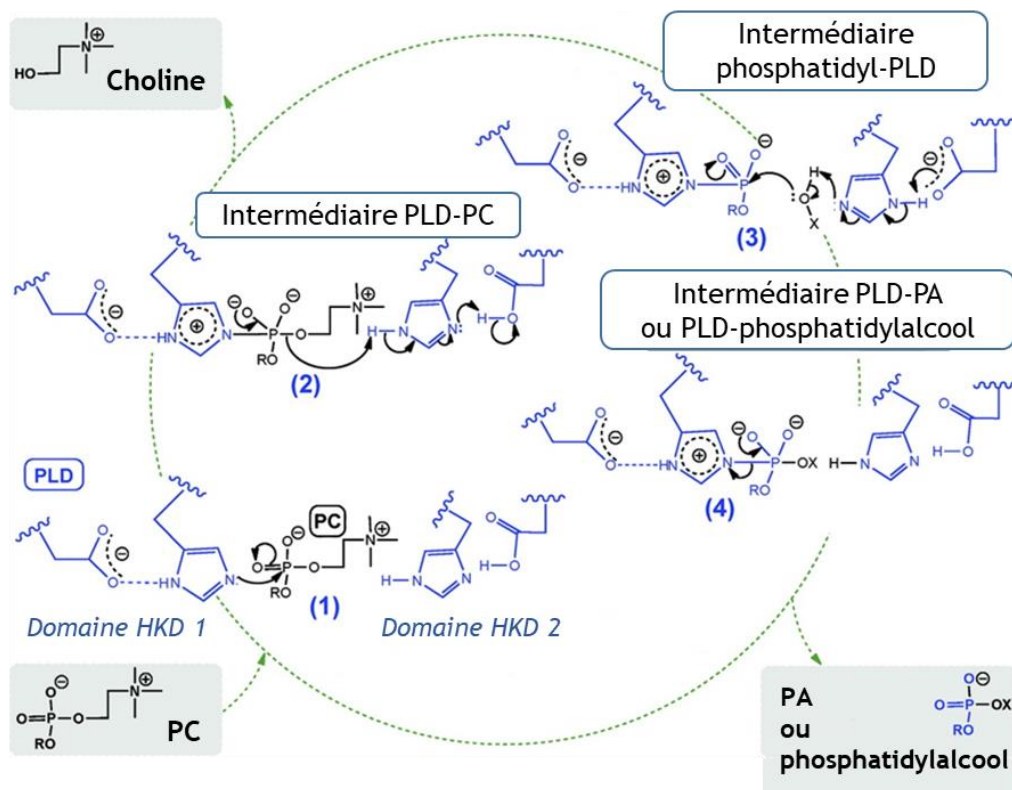


Figure 22 : Mécanisme catalytique des PLD

(Adapté de Selvy et al., 2011)

Les deux domaines HKD participent à la réaction, en impliquant chacun un résidu histidine. Au début du cycle réactionnel (1), le groupement amine en HKD 1 effectue une attaque nucléophile sur la PC, formant ainsi un intermédiaire PLD-PC via une liaison phosphoramidate (2). Cette liaison est ensuite rompue par le groupement amine en HKD 2, ce qui libère la choline en établissant un intermédiaire phosphatidyl-PLD. Lorsque le nucléophile est pris en charge par la PLD, il est oxydé par le groupement amine en HKD 2 (3). Cela entraîne son transfert sur le groupement phosphate, conduisant à la formation d'un intermédiaire PLD-PA ou PLD-phosphatidylalcool (4). Enfin, la rupture de la liaison phosphoramidate permet de libérer le PA ou phosphatidylalcool néosynthétisé.

R = groupement DAG

$X = H$ si hydrolyse / $X = (CH_2)_nCH_3$ si transphosphatidyltion avec un alcool primaire

2. Mesure de l'activité enzymatique des PLD

Plusieurs méthodes ont été décrites pour mesurer l'activité de la PLD dans des cellules intactes ou en système acellulaire. Celles-ci sont généralement basées sur le dosage des produits formés par l'enzyme dans le milieu réactionnel. Initialement, les mesures étaient effectuées par radioactivité, car c'est une des méthodes les plus sensibles et qui présente l'avantage d'être très polyvalente, permettant de doser l'activité PLD aussi bien *in vitro* que directement sur des cellules en culture. Cette technique a été progressivement délaissée par la suite au vu de ses contraintes techniques importantes et a été supplantée aujourd'hui par des dosages par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie, représentant un bon compromis en termes de simplicité d'utilisation et de sensibilité de détection. La mesure directe du PA présentant des inconvénients non négligeables, l'activité PLD est le plus souvent mesurée de façon indirecte, à travers le dosage soit du produit hydrosoluble libéré durant la réaction, comme la choline, soit de phosphatidylalcool non métabolisable.

a. Mesure du produit lipidique

La mesure directe de l'activité PLD a été effectuée initialement par la mesure de la radioactivité du PA formé après activation de l'enzyme. Cette méthode emploie des phospholipides substrats marqués par un atome radioactif comme le tritium sur une des chaînes acyles (Huang et Cabot, 1990). Une méthode colorimétrique a également été développée afin de déterminer la spécificité de substrat des PLD. Elle est basée sur le dosage du phosphate inorganique généré par la phosphatase alcaline, suite à la formation de PA par la PLD (Martin *et al.*, 2000).

Cependant, la mesure totale du PA produit *via* ces techniques ne reflète pas toujours l'activité PLD, puisque le substrat peut être métabolisé par d'autres phospholipases et ensuite être pris en charge par d'autres enzymes de biosynthèse du PA, notamment les DGK. La spécificité de l'activité PLD ou DGK peut par exemple être discriminée par l'ajout de [³²P]ATP, dont la mesure permet de déterminer si le groupement phosphate est nouvellement ajouté ou s'il provient du substrat. Plus récemment, une nouvelle méthode plus spécifique de l'activité PLD et permettant d'évaluer son activité en temps réel a été mise au point. Cette méthode utilise la 8-hydroxyquinoléine, une molécule capable de former un complexe fluorescent avec le groupement phosphate en présence de certains ions métalliques (Rahier *et al.*, 2016).

De plus, le fait que le PA soit très rapidement métabolisé dans la cellule peut entraîner une sous-estimation importante de l'activité PLD. Afin de remédier à cela, le dosage de l'activité de la PLD à partir de cellules ou de tissus a longtemps utilisé la propriété de transphosphatidylation de cette enzyme. Les phosphatidylalcools présentent les avantages de ne pas être métabolisables par les enzymes cellulaires et d'être facilement quantifiables. L'ajout d'alcools primaires en faible concentration dans le milieu réactionnel empêche également toute confusion avec le PA issu du

DAG. C'est donc une méthode de mesure sensible et hautement spécifique de l'activité enzymatique de la PLD (Randall et al., 1990; Morris et al., 1997). L'activité de transphosphatidylolation est mesurable soit *via* l'emploi d'un phospholipide contenant un acide gras tritié, soit par l'ajout d'un alcool primaire tritié.

b. Mesure du produit hydrosoluble

L'activité PLD peut également être mesurée de façon indirecte par dosage de la choline libérée par l'hydrolyse de la PC. La tête polaire de la PC est alors marquée avec de la choline tritiée, dont la radioactivité sera dosée une fois libérée dans le milieu réactionnel. Il est également possible de quantifier la choline par mesure de chimiluminescence (Pedruzzi et al., 1998). Toutefois la mesure de ce groupement polaire présente des limites similaires à celle du PA *in cellulo*. En effet, la PLC peut lyser le substrat pour former de la phosphocholine, qui peut ensuite être transformée en choline sous l'action d'une phosphatase. De plus, la choline libérée dans des cellules intactes est rapidement phosphorylée pour former du DAG par exemple (Besterman et al., 1986). Ce type de mesure est donc plus adapté à des extraits membranaires ou des vésicules artificielles.

Les tests présentés précédemment présentent l'inconvénient de se fonder sur l'utilisation de substrats synthétiques, empêchant par conséquent l'étude des paramètres cinétiques de la PLD vis-à-vis des substrats naturels. Par ailleurs, les groupements chromophores et fluorophores de ces phospholipides sont composés de cycles aromatiques qui induisent un encombrement stérique important et risquent ainsi d'empêcher une prise en charge optimale par le site actif de l'enzyme. Par la suite, une méthode de dosage des activités PLD fondée sur la quantification de la choline libérée lors de l'hydrolyse de la PC a été développée (Takrama et Taylor, 1991). Dans ce test couplé, la choline libre est prise en charge par la choline oxydase afin de former du peroxyde d'hydrogène, lui-même substrat de la peroxydase. Cette méthode permet finalement de quantifier la production de choline par la PLD, *via* le dosage de produits finaux chromogéniques ou fluorescents en utilisant la méthode de l'Amplex Red (Zhou et al., 1997). Il est à noter que ce dosage nécessite une activité PLD relativement élevée dans l'échantillon car il présente un signal basal fort dû aux niveaux de choline cellulaire déjà importants en l'absence de toute activité PLD.

3. Inhibition de l'activité PLD

De nombreux outils ont été utilisés pour étudier les rôles physiologiques des PLD chez les mammifères. Les stratégies classiques d'inactivation de l'enzyme endogène reposent sur la délétion du gène pour créer des modèles PLD1 ou PLD2 KO, l'extinction temporaire de l'expression des PLD par ARN interférence ou encore l'inhibition de l'activité enzymatique. Les deux premières stratégies ont permis de démontrer l'implication des PLD dans de nombreux processus cellulaires (Bruntz et al., 2014a). Cependant l'étude des mécanismes d'action précis du PA requiert un contrôle temporel de l'activation de l'enzyme, qui n'est possible que grâce à

l'inhibition de son activité à un moment précis. De plus, contrairement à la modification génique, les molécules pharmacologiques sont utilisables de façon simple sur tous les types de cellules incluant les cultures primaires, et potentiellement disponibles en clinique.

a. Les inhibiteurs chimiques historiques et leurs limites

Comme décrit précédemment, en présence d'alcools primaires, la réaction catalytique des PLD est orientée vers la transphosphatidylation au détriment de l'hydrolyse. Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'un mécanisme d'inhibition mais la formation du phosphatidylalcool empêche celle du PA et interfère ainsi avec ses fonctions cellulaires. L'ajout d'alcools primaires comme le 1-butanol ou l'éthanol dans le milieu extracellulaire a ainsi été extrêmement utilisé et est resté longtemps l'unique méthode pour bloquer l'activité de la PLD (Burkhardt *et al.*, 2014a). Cette méthode comporte toutefois une limitation majeure, qui consiste en l'évaluation des éventuels effets aspécifiques de l'alcool. Le plus souvent, un alcool secondaire est utilisé comme contrôle, puisque cette classe n'est pas métabolisable par la PLD. Néanmoins, cela n'exclut pas que l'alcool primaire ait un rôle en lui-même sur des processus cellulaires régulés ou non par les PLD.

Les résultats obtenus avec ce type d'inhibition doivent alors être analysés avec une grande précaution. En effet, il existe de nombreuses incertitudes quant aux effets de l'utilisation des alcools primaires sur des cellules en culture, notamment vis-à-vis des effets sur différentes voies de signalisation. Cette méthode s'est avérée d'autant plus discutable lorsque certains résultats obtenus avec des alcools primaires n'ont pas pu être reproduits avec l'utilisation plus récente d'oligonucléotides antisens (siRNA, *small interfering RNA*) ou d'inhibiteurs pharmacologiques des PLD (Nelson *et Frohman*, 2015). Une méthode d'inhibition plus spécifique est donc apparue comme nécessaire afin d'obtenir des données plus fiables. Enfin, l'utilisation de 1-butanol ne permet pas de distinguer la fonction spécifique de l'une des isoformes, mais est représentatif de l'activité globale des cellules. Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques depuis quelques années a alors représenté une avancée majeure dans la caractérisation biologique des PLD ainsi que dans le développement de nouvelles thérapies (Vitale *et al.*, 2010).

b. Les inhibiteurs pharmacologiques spécifiques

Des efforts de recherche d'inhibiteurs des PLD ont ainsi conduit depuis la fin des années 1990 à l'identification de plusieurs composés pouvant bloquer l'action de ces enzymes, mais pas toujours de façon directe et spécifique (Selvy *et al.*, 2011). La recherche d'inhibiteurs de PLD a pris un nouveau tournant en 2007 avec l'identification de l'halopémide, une molécule utilisée comme psychotrope, au cours d'un criblage d'inhibiteurs de la hPLD2 effectué par la société Novartis (Monovich *et al.*, 2007). L'halopémide est capable d'inhiber la hPLD2 (IC₅₀ de 310 nM *in vitro* et de 300 nM *in cellulo*), mais également la hPLD1 (IC₅₀ de 220 nM *in vitro* et de 21 nM *in cellulo*). Un travail d'optimisation de la structure de cet inhibiteur non-sélectif a été entrepris afin de potentialiser son effet (figure 23). Cela a amené à la conception de plusieurs dérivés, dont le

FIPI (5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopémide) qui présente une meilleure efficacité à inhiber les PLD1 (IC₅₀ de 9,5 nM *in vitro* et 1 nM *in cellulo*) et PLD2 (IC₅₀ de 17 nM *in vitro* et de 44 nM *in cellulo*) (Scott *et al.*, 2009).

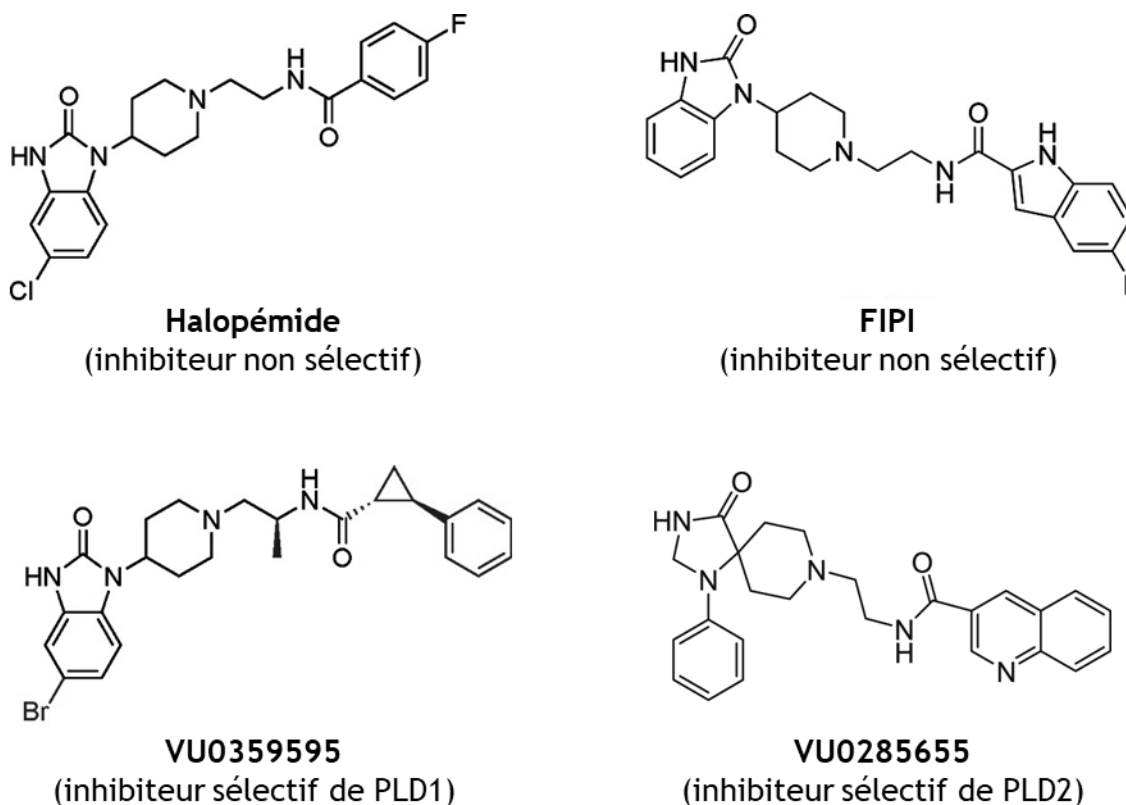


Figure 23 : Structure chimique d'inhibiteurs de PLD dérivant de l'halopémide

Néanmoins, comme le montrent leurs IC₅₀, l'halopémide et le FIPI ne présentent pas de réelle spécificité vis-à-vis d'une isoforme. Ce travail s'est alors poursuivi dans le but de produire des analogues synthétiques de l'halopémide sélectifs vis-à-vis des PLD1 ou 2, non disponibles jusqu'alors. Par exemple, le composé VU0359595 est un inhibiteur sélectif de la PLD1, capable d'inhiber les hPLD1 et hPLD2 avec des IC₅₀ respectives de 3,7 nM et de 6400 nM *in vitro*, tandis que le VU0285655 est sélectif de la PLD2 puisqu'il présente des IC₅₀ respectives de 1900 nM et de 90 nM pour les hPLD1 et hPLD2 (Scott *et al.*, 2009). Plusieurs molécules analogues ont été synthétisées à partir de celles-ci et commercialisées.

L'utilisation de ces inhibiteurs a permis non seulement de discriminer le rôle cellulaire de chaque isoforme, mais également d'entrevoir une application thérapeutique à ces molécules. En effet, des tests précliniques avec des inhibiteurs de PLD ont révélé des effets encourageants dans différentes pathologies cancéreuses ou infectieuses, en particulier au vu de leur faible toxicité *in vivo* (Brown *et al.*, 2017). Des essais cliniques de phase 2 sont d'ailleurs actuellement en cours aux Etats-Unis pour le traitement du cancer du sein. Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs n'est pas encore totalement décrit. Une étude récente a permis de montrer que le FIPI se lie au niveau

du site actif de l'enzyme, alors qu'un inhibiteur sélectif de PLD2 (VU0364739) se lie avec une haute affinité sur un site allostérique de l'enzyme (Ganesan *et al.*, 2015). Il faut cependant garder à l'esprit que, bien que prometteuse, la piste des inhibiteurs de PLD utilisés comme agent thérapeutique risque de se heurter aux multiples fonctions exercées par les PLD1 et PLD2, nécessitant de trouver des conditions optimales d'utilisation.

C. Structure primaire des PLD

L'alignement des séquences peptidiques des PLD trouvées dans les différents règnes du vivant a révélé quatre régions hautement conservées (I-IV) au cours de l'évolution, présentes sur les enzymes des levures, des végétaux et des animaux. Ces régions comprennent notamment deux motifs HKD, et ont été décrites comme étant directement responsables de l'activité catalytique de la PLD (Frohman et Morris, 1999). Pour la majorité des PLD eucaryotes, ce cœur catalytique est entouré de séquences régulatrices de l'activité ou de la localisation des PLD, situées en position N-ter et C-ter. Chez les mammifères en particulier, la structure des PLD1-6 est caractérisée par la présence d'au moins une séquence consensus HKD, ainsi que de différentes régions au rôle spécifique, notamment pour les PLD1 et PLD2 (**figure 19**).

1. Le site catalytique

a. Les régions conservées II et IV (domaines HKD)

Les régions II et IV comprennent chacune un motif HKD, qui est crucial pour l'activité enzymatique *in vitro* et *in vivo* (McDermott *et al.*, 2004). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la présence des trois résidus H, K et D est nécessaire pour la catalyse. Par ailleurs, la présence simultanée des deux domaines HKD est indispensable pour l'activité catalytique de la PLD, la délétion de l'un de ces motifs entraînant la perte de son activité (Sung *et al.*, 1997). Pour être fonctionnelles, les deux motifs HKD en position N-ter et C-ter doivent nécessairement se replier de manière à se rapprocher et ainsi former le site catalytique des PLD (Xie *et al.*, 1998, 2000). L'étude de la structure tridimensionnelle des PLD bactériennes a permis d'établir un modèle structural de la catalyse, les PLD de mammifères n'ayant pas encore pu être cristallisées. Les deux domaines HKD forment une poche dans laquelle s'insère le phospholipide substrat. Ainsi les PLD à consensus HKD adoptent généralement une conformation dite en « selle de cheval » qui leur permet de former un motif catalytique complet, en réunissant leurs résidus catalytiques (Stuckey et Dixon, 1999 ; Leiros *et al.*, 2000). Ces observations ont conforté la nécessité d'une dimérisation des PLD ne comportant qu'un seul motif HKD, telle que la PLD6, pour obtenir un site actif fonctionnel.

b. Les régions conservées I et III

Les régions I et III sont également importantes pour la catalyse, puisque des mutations de certains résidus qui les composent diminuent ou inhibent l'activité enzymatique de la PLD

(Frohman *et al.*, 1999). Chez les mammifères, ces régions n'ont été identifiées que sur les isoformes PLD1 et PLD2.

La fonction précise de la région I n'a pas encore été clairement identifiée, mais des mutations effectuées dans la PLD1 ont montré que certains des acides aminés présents au niveau de cette région sont indispensables au fonctionnement de l'enzyme. La mutation d'une leucine en aspartate entraîne notamment une perte totale de l'activité chez la PLD1 humaine (Sung *et al.*, 1997).

La région III, également appelée motif « IYIENQFF », est située entre les deux motifs HKD. Cette région se retrouve très conservée entre les espèces à l'exception des PLD bactériennes. Son rôle n'a pas encore été déterminé, mais des études de mutagenèse dirigée sur la PLD1 ont démontré que cette région occupe une position critique dans l'activation de la PLD (Sung *et al.*, 1997). L'une des hypothèses envisagées propose que cette région soit impliquée dans la fixation spécifique de la PC comme substrat. En effet, la région III est enrichie en résidus aromatiques, tout comme le domaine de liaison à la choline du récepteur à l'acétylcholine et de certaines cholinestérases (Gilson *et al.*, 1994). On peut alors imaginer que cette région interagit avec la tête polaire de la PC pour faciliter la catalyse *via* le rapprochement des deux domaines HKD ou plus vraisemblablement pour limiter la spécificité de la PLD aux phospholipides qui portent un groupement polaire de type choline (Frohman *et al.*, 1999). Une seconde hypothèse suggère quant à elle que la région III serait impliquée dans l'adressage des PLD aux cavéoles, puisque cette région code également une séquence consensus de liaison à la cavéoline (Okamoto *et al.*, 1998).

c. Le domaine de liaison au PI(4,5)P₂

L'activité des PLD1 et PLD2 est fortement dépendante de la présence de PI(4,5)P₂. Un domaine de liaison à ce phosphoinositide, contenant un motif riche en acides aminés aromatiques et basiques (motif polybasique), a été identifié entre les deux domaines HKD, en amont de la région III. L'association de ce domaine avec le PI(4,5)P₂ est nécessaire à l'activation des PLD de levure et de mammifères, puisque la mutation de certains acides aminés basiques de ce motif entraîne une perte de l'activité enzymatique des PLD (Sciorra *et al.*, 1999 ; Du *et al.*, 2003).

d. La boucle centrale de la PLD1

La PLD1 possède une région spécifique de 116 acides aminés appelée *loop* ou « boucle centrale de la PLD1 », située entre le premier motif HKD (région II) et le domaine de liaison au PI(4,5)P₂. Cette région est totalement absente de la PLD2 et joue un rôle important sur la régulation du niveau d'activité basale de la PLD1. La délétion de la boucle centrale de la PLD1 provoque une augmentation de son activité basale alors que son insertion dans la PLD2 entraîne l'inverse, ce qui suggère que cette boucle possède une activité régulatrice négative permettant de maintenir l'activité constitutive de la PLD1 à un niveau faible (Sung *et al.*, 1999a, 1999b). La boucle

centrale de la PLD1 serait donc impliquée dans un mécanisme d'autoinhibition de l'enzyme, permettant une régulation fine de son activité.

2. Les régions régulatrices

Selon les espèces, les PLD présentent un ou plusieurs domaines régulateurs, qui contribuent à l'activation des enzymes mais également à leur localisation aux membranes. Parmi ces domaines, on retrouve par exemple l'hélice transmembranaire des PLD3-6 humaines qui permet leur ancrage à la membrane du RE ou à la membrane externe de la mitochondrie (Frohman, 2015). D'autres régions régulatrices plus conservées sont retrouvées chez certaines PLD végétales, la PLD de levure (Spo14) et les isoformes PLD1 et PLD2 chez les mammifères. Il s'agit du domaine d'homologie à phox (domaine PX) et du domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH) (Hodgkin *et al.*, 2000 ; Sugars *et al.*, 2002). Ces deux domaines sont composés chacun d'une centaine de résidus et sont positionnés en N-ter, en amont de la région I. Ils sont capables d'interagir avec les PIP et contribuent ainsi à la localisation des PLD au niveau de certains compartiments membranaires (Du *et al.*, 2003).

a. Le domaine PX

Le domaine PX a été décrit dans de nombreuses protéines de signalisation ayant une fonction dans le trafic membranaire, qui sont le plus souvent localisées sur des compartiments endosomaux (Seet et Hong, 2006). Ce domaine est impliqué dans une grande variété d'interactions protéine-protéine, permettant notamment l'interaction avec des protéines kinases et des protéines présentant un domaine SH3 (*Src homology 3*). Par ailleurs, le domaine PX est également responsable d'interactions protéine-membrane en se liant aux phospholipides, et plus particulièrement aux PIP (Ellson *et al.*, 2002).

Les PLD sont ainsi capables de fixer différents PIP, tels que les PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, avec une affinité préférentielle en général pour le PI3P grâce à un acide aminé basique en position centrale du domaine PX (Xu *et al.*, 2001). L'étude des interactions protéine-lipide *in vitro* à l'aide de membranes de nitrocellulose et de liposomes a permis de montrer que le domaine PX de la PLD1 lie plus spécifiquement le PI(3,4,5)P₃ (Lee *et al.*, 2005). Une interaction du domaine PX de la PLD1 avec le PI5P (phosphatidylinositol-5-phosphate) a également été observée par Du et collègues, qui ont montré que cette liaison permet de cibler la PLD1 vers des vésicules d'endocytose où le PI5P est enrichi (Du *et al.*, 2003). Le domaine PX semble donc jouer un rôle dans le recrutement membranaire des PLD, la combinaison de divers PIP au sein des membranes permettant une régulation précise de la localisation subcellulaire de l'enzyme. Des mutations ponctuelles de la PLD1 ont suggéré que le domaine PX n'est cependant pas essentiel pour la catalyse *in vitro*, et la délétion du domaine PX chez la PLD1 de cellules neuroendocrines n'affecte pas sa capacité à stimuler l'exocytose (Du *et al.*, 2003). Toutefois, des

mutations dans ce domaine entraînent une activité basale plus élevée de la PLD1 *in vivo*, suggérant que celui-ci peut participer à l'autoinhibition de la PLD1 (Sung *et al.*, 1999a).

En se basant sur la structure 3D du domaine PX de la protéine p47^{phox}, une étude a montré que le domaine PX de la PLD1 forme deux poches, dont une qui lie la tête polaire des PIP. La deuxième poche présente un site secondaire de liaison riche en acides aminés basiques (Arginine et Histidine), qui lie modérément le PA ou la PS. Le PA coopère avec les PIP pour augmenter la liaison du domaine PX avec les liposomes (Stahelin *et al.*, 2004). Le site de liaison au PA du domaine PX semble donc être impliqué dans la stabilisation de l'interaction entre la protéine et la membrane, tel que cela a été récemment démontré pour la protéine DOCK2, un régulateur de la GTPase Rac (Nishikimi *et al.*, 2009). De plus, grâce à son domaine PX, la PLD1 lie également deux protéines impliquées dans le trafic membranaire : Munc18 et la dynamine (Lee *et al.*, 2004, 2006). On peut également mentionner qu'un site de phosphorylation de la PLD1 au sein du domaine PX semble jouer un rôle important dans la fonction de la PLD1 au cours de la neurosécrétion (Zeniou-Meyer *et al.*, 2008).

b. Le domaine PH

Le domaine PH, quant à lui, est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal. Ce domaine est capable de se lier à des PIP diphosphorylés possédant leurs phosphates en position vicinale, comme le PI(4,5)P₂ et le PI(3,4)P₂ (Hodgkin *et al.*, 2000).

Via la liaison au PI(4,5)P₂, le domaine PH joue un rôle dans la localisation et l'ancrage de protéines au sein de la membrane plasmique (Sciorra *et al.*, 2002). Le domaine PH de la PLD présente une haute sélectivité pour le PI(4,5)P₂, mais une liaison de faible affinité avec ce lipide. Il a été proposé dans un premier temps que le domaine PH puisse être à l'origine de la dépendance de l'activité des PLD à ce phosphoinositide. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de délétion du domaine PH dans la séquence des PLD1 et PLD2 ont été réalisées. L'analyse des mutants a révélé que le domaine PH n'est pas nécessaire à l'activité enzymatique des PLD (Sung *et al.*, 1999a, 1999b ; Hoër *et al.*, 2000). Comme décrit précédemment, un autre domaine de liaison au PI(4,5)P₂ a ensuite été localisé dans le site catalytique de ces PLD et identifié comme responsable de l'activation de l'enzyme par ce phosphoinositide (Sciorra *et al.*, 1999 ; Du *et al.*, 2003). Ces expériences de délétion du domaine PH ont toutefois montré une augmentation de l'activité de la PLD1 suite à la stimulation par des GTPases, suggérant une forme de régulation négative par cette région de la protéine (Sung *et al.*, 1999a, 1999b).

Ainsi, le domaine PH des PLD interviendrait plutôt dans l'interaction avec les membranes et déterminerait la localisation membranaire de l'enzyme. En effet, des mutations ponctuelles ou la délétion totale de ce domaine supprime l'association des PLD avec certaines membranes et entraîne une relocalisation diffuse de la protéine dans le cytoplasme dans plusieurs types cellulaires (Zhang *et al.*, 1999 ; Emoto *et al.*, 2000 ; Hodgkin *et al.*, 2000 ; Sciorra *et al.*, 2002 ;

Sugars *et al.*, 2002). La localisation fonctionnelle de la PLD1 ne semble pas être régulée par l'interaction du domaine PH avec le PI(4,5)P₂, mais plutôt par la palmitoylation de deux cystéines situées au sein du domaine PH, en position 240 et 241. L'effet de cette palmitoylation est variable en fonction du type cellulaire. L'ajout de ces deux chaînes d'acides gras peut favoriser l'association de la PLD1 aux microdomaines membranaires riches en cholestérol et en cavéoline impliqués dans la formation des endosomes, et joue un rôle dans l'internalisation de la PLD1 (Han *et al.*, 2002 ; Sugars *et al.*, 2002). De plus, lorsque la PLD1 est mutée au niveau de ces deux résidus, elle se dissocie de la membrane plasmique (Du *et al.*, 2003).

c. Les extrémités N-ter et C-ter

L'extrémité N-ter des PLD est la moins conservée entre de nombreuses espèces, de la levure à l'homme. Cette région semble tolérer la fusion avec des peptides « étiquettes » (*tags*) tels que le motif poly-histidine (6-His), l'hémagglutinine (HA) ou la GFP, sans que cette fusion n'entraîne de modification de l'activité enzymatique. Cependant elle semble contribuer à la régulation de l'activité des PLD1 et PLD2. Plusieurs études ont montré que l'extrémité N-ter de la PLD1 contient un site d'interaction avec la PKC, et que cette liaison est impliquée dans la régulation de l'activité de l'enzyme (Xie *et al.*, 1998 ; Sung *et al.*, 1999a). Par ailleurs, cette région participerait à la maintenance d'une activité basale élevée chez la PLD2, puisque la délétion des 308 premiers acides aminés de sa séquence conduit à une enzyme de faible activité basale qui, de façon surprenante, devient plus sensible *in vitro* à l'activation par les GTPases de type Arf (Sung *et al.*, 1999b).

L'extrémité C-ter en revanche est relativement bien conservée entre les PLD et participe à l'activité catalytique. En effet, des mutations ou des délétions de certains des résidus en C-ter entraînent une réduction voire une suppression de cette activité (Xie *et al.*, 1998 ; Sung *et al.*, 1999a, 1999b ; Liu *et al.*, 2001). Il a donc été proposé que les résidus situés à cette extrémité interagissent directement avec le site actif des PLD. Contrairement à l'extrémité N-ter, la fusion de protéines étiquettes sur cette région peut donc altérer l'activité enzymatique. Alors que le domaine N-ter apparaît essentiel pour la localisation membranaire de la PLD1, le domaine C-ter est important pour la régulation de son activité enzymatique (McDermott *et al.*, 2004). L'extrémité C-ter des PLD1 et PLD2 comporte ainsi des sites de régulation par les GTPases des familles Rho et Arf (Sung *et al.*, 1999a ; Yamazaki *et al.*, 1999). Néanmoins, le domaine C-ter de la PLD1 semble aussi jouer un rôle dans sa localisation endosomale (Hughes et Parker, 2001).

D. Localisation des PLD

Une activité PLD a été détectée dans la plupart des types cellulaires chez les mammifères (Jenkins et Frohman, 2005). Les PLD1 et PLD2 sont exprimées dans quasiment tous les tissus de l'organisme, mais dans des proportions différentes selon les organes étudiés. Du fait du manque d'anticorps spécifiques pour détecter ces isoformes par immunofluorescence, les connaissances

actuelles sur leur distribution se basent le plus souvent sur la détection des transcrits dans les tissus ou la visualisation de protéines avec une étiquette surexprimées dans les cellules.

1. Localisation tissulaire

L'isoforme PLD1 semble exprimée à des niveaux variables dans l'organisme. Les premières études de caractérisation des PLD chez les rongeurs ont rapporté un niveau d'expression élevé de cette isoforme dans certains organes comme le cœur, le cerveau, la rate et le pancréas, alors qu'une très faible quantité de transcrits a été détectée au niveau des poumons, du thymus, de la trachée, des ganglions lymphatiques et les leucocytes circulants (Steed *et al.*, 1998). Au niveau du système nerveux, la PLD1 s'exprime fortement et de façon ubiquitaire. L'expression de cette isoforme a notamment été détectée chez la souris et le rat dans les neurones de l'hippocampe, du bulbe olfactif, du cortex et du cervelet, ainsi que dans la rétine et la moelle épinière (Colley *et al.*, 1997a ; Lee *et al.*, 2000a). L'expression de la PLD1 est maximale lors du développement des neurones et diminue drastiquement après leur différenciation et leur migration (Ammar *et al.*, 2013). De la même façon, les transcrits de PLD1 sont détectables dans les fibres musculaires en développement mais ne le sont plus dans le muscle squelettique chez le rat adulte (Katayama *et al.*, 1998). Dans les tissus exprimant la PLD1, le variant PLD1b semble majoritairement présent, et le niveau de PLD1a est variable selon les tissus (Katayama *et al.*, 1998 ; Steed *et al.*, 1998 ; Millar *et al.*, 1999). L'expression de la PLD2 apparaît beaucoup plus vaste et homogène, puisqu'elle est retrouvée dans le cœur, le thymus, la prostate, les ovaires, la thyroïde, la trachée, la rate, le cerveau et la moelle épinière chez l'homme et le rongeur. Elle est exprimée à un niveau élevé dans les organes, à l'exception du foie et du muscle squelettique (Colley *et al.*, 1997b ; Kodaki et Yamashita, 1997). Des trois variants de la PLD2, PLD2a est le plus largement exprimé quel que soit le tissu examiné.

2. Localisation subcellulaire

À l'échelle cellulaire, une activité PLD a été détectée au niveau des différentes membranes, incluant la membrane plasmique (Whatmore *et al.*, 1996), l'enveloppe nucléaire (Balboa et Insel, 1995), les mitochondries (Madesh et Balasubramanian, 1997), le RE (Decker *et al.*, 1996), l'appareil de Golgi, ainsi que les endosomes et granules de sécrétion (Provost *et al.*, 1996 ; Czarny *et al.*, 1999). Par la suite, des études de fractionnement subcellulaire combinées à des expériences d'immunocytochimie ont permis de préciser la localisation des différentes isoformes. Au moins une des isoformes a ainsi été retrouvée dans chaque compartiment membranaire. Cependant la répartition de chaque isoforme semble être dépendante du type cellulaire étudié. De façon générale, les PLD1 et PLD2 possèdent des distributions subcellulaires spécifiques, qui évoluent de façon dynamique en fonction de l'état d'activation de la cellule.

La localisation de la PLD1 a fait l'objet de nombreuses controverses liées à la variabilité des observations, selon la technique employée et d'un type cellulaire à l'autre (Roth, 2008). La

PLD1 surexprimée a été retrouvée au niveau de structures vésiculaires périnucléaires (correspondant à des lysosomes, des granules de sécrétion et des endosomes) dans des fibroblastes embryonnaires de rat, les lignées de fibroblastes COS-1 et de basophiles RBL-2H3 (Colley *et al.*, 1997a ; Brown *et al.*, 1998 ; Hughes et Parker, 2001). La PLD1 endogène en revanche a été détectée par immunocytochimie majoritairement au niveau de l'appareil de Golgi, ainsi que du RE, des endosomes et à la membrane plasmique (Colley *et al.*, 1997a ; Sung *et al.*, 1999a ; Freyberg *et al.*, 2001 ; Lucocq *et al.*, 2001 ; Vitale *et al.*, 2001). Ktistakis et collègues avaient déjà montré auparavant l'existence d'une activité PLD dépendante d'Arf dans des fractions membranaires, dont la plus importante était observée dans les fractions enrichies en membranes golgiennes par rapport aux autres (Ktistakis *et al.*, 1995). La présence de la PLD1 au niveau de l'appareil de Golgi reste cependant un sujet de débat entre différents groupes, puisque les deux approches utilisées ont chacune leurs limites. D'une part, la surexpression de la PLD1 pourrait causer une localisation artéfactuelle de l'enzyme vers une classe hétérogène de vésicules au détriment de l'appareil de Golgi, et d'autre part la spécificité des anticorps utilisés dans l'approche impliquant de l'immunocytochimie peut également être discutable, au vu de la qualité médiocre des anticorps anti-PLD1 disponibles à ce jour. Cependant, un certain nombre de données fonctionnelles sous-tend la participation des PLD dans la formation des vésicules de transport à partir de l'appareil de Golgi (Roth *et al.*, 1999).

Dans certaines études, la PLD1 a été retrouvée principalement à la membrane plasmique. Par exemple, dans des cellules de foie de rat, l'activité PLD1 la plus importante a été quantifiée au niveau de la membrane plasmique, bien qu'une activité significative soit également retrouvée au niveau du noyau et de l'appareil de Golgi (Provost *et al.*, 1996). Dans les cellules neuroendocrines de type chromaffines, la PLD1 sauvage est constitutivement localisée à la membrane plasmique, de même que la PLD1 catalytiquement inactive ou un mutant non activable par la PKC (Vitale *et al.*, 2001). Une association de la PLD1 au niveau de microdomaines de la membrane plasmique enrichis en cavéoline-1 a aussi été rapportée dans la lignée de fibroblastes COS-7, les myoblastes et les lymphocytes (Kim *et al.*, 2000 ; Meacci *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2000 ; Diaz *et al.*, 2002). Enfin, après activation des GTPases Rho et Arf, la PLD1 a été localisée dans des fractions insolubles contenant des éléments du cytosquelette d'actine et ses protéines associées telle l' α -actinine dans les lignées de monocytes U397 et de neutrophiles HL60 (Hodgkin *et al.*, 1999 ; Iyer et Kusner, 1999). La PLD1 surexprimée quant à elle colocalise partiellement avec l'actine corticale dans la lignée de cellules neuroendocrines PC12, ainsi que dans les cellules COS-7 et les basophiles RBL-2H3 (Lee *et al.*, 2001 ; Vitale *et al.*, 2001 ; Powner *et al.*, 2002).

Par ailleurs, plusieurs groupes ont établi par la suite que la localisation de la PLD1 était loin d'être statique et que cette isoforme peut être recyclée entre différents compartiments membranaires, ce qui peut expliquer en partie la variabilité des résultats obtenus. Cette translocation de la PLD1 a lieu de façon régulée et est cruciale pour le fonctionnement de l'enzyme.

Dans les cellules RBL-2H3, PLD1b-GFP et PLD1b-HA ont été trouvées au niveau de granules de sécrétion, puis à la membrane plasmique après stimulation des cellules (Brown *et al.*, 1998 ; Choi *et al.*, 2002 ; Powner *et al.*, 2002). Une étude réalisée en collaboration avec notre équipe a également montré que la PLD1 surexprimée dans les cellules COS-7 est localisée sur des endosomes périnucléaires et l'appareil de Golgi. Cependant, suite à l'activation de la PKC dans ces cellules, la PLD1 transloque à la membrane plasmique avant de redevenir présente au niveau des endosomes au bout de quelques heures. De plus, il semble que le trafic de ces vésicules soit facilité par l'activité de la PLD1, puisqu'un mutant catalytiquement inactif (PLD1K898R) n'est pas transporté à la membrane plasmique après stimulation (Du *et al.*, 2003). Cette translocation entre des vésicules périnucléaires et la membrane plasmique a également été démontrée dans la lignée d'adipocytes 3T3-L1 suite à l'application d'insuline (Emoto *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2005), ainsi que dans la lignée de cellules β pancréatiques MIN6 après stimulation de l'exocytose (Hughes *et al.*, 2004).

La caractérisation structurale des PLD a montré que la localisation subcellulaire de la PLD1 implique les domaines de régulation PH et PX, qui sont indispensables pour son internalisation de la membrane plasmique vers des vésicules périnucléaires. En résumé, le domaine PH faciliterait l'entrée de la PLD1 au sein des microdomaines lipidiques de la membrane plasmique, alors que l'interaction entre le domaine PX et le PI5P favoriserait un recyclage efficace de la PLD1 dans les endosomes (figure 24). L'interaction avec le PI(4,5)P₂ est également nécessaire à la localisation de la PLD1 à la membrane plasmique. En effet, la mutation du motif polybasique permettant l'interaction avec ce phosphoinositide conduit à une expression complètement cytosolique de la PLD1 dans différents types cellulaires (Du *et al.*, 2003).

La PLD2 en revanche se localise préférentiellement à la membrane plasmique dans de nombreux types cellulaires (Colley *et al.*, 1997b ; Honda *et al.*, 1999 ; Corrotte *et al.*, 2006 ; Roth, 2008), et une association aux microdomaines lipidiques associés à la cavéoline a aussi été rapportée pour cette isoforme (Czarny *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2000). Dans les fibroblastes embryonnaires de rat, la PLD2 surexprimée peut être redistribuée vers les compartiments vésiculaires sous-membranaires lorsque les cellules sont stimulées (Colley *et al.*, 1997b). La PLD2 a également pu être observée en bordure du Golgi par immunolocalisation dans des cellules rénales NKT et la lignée hypophysaire GH3 (Freyberg *et al.*, 2002). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la PLD2 colocalise avec l'actine-F et l' α -actinine (Honda *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2001 ; O'Luanaigh *et al.*, 2002).

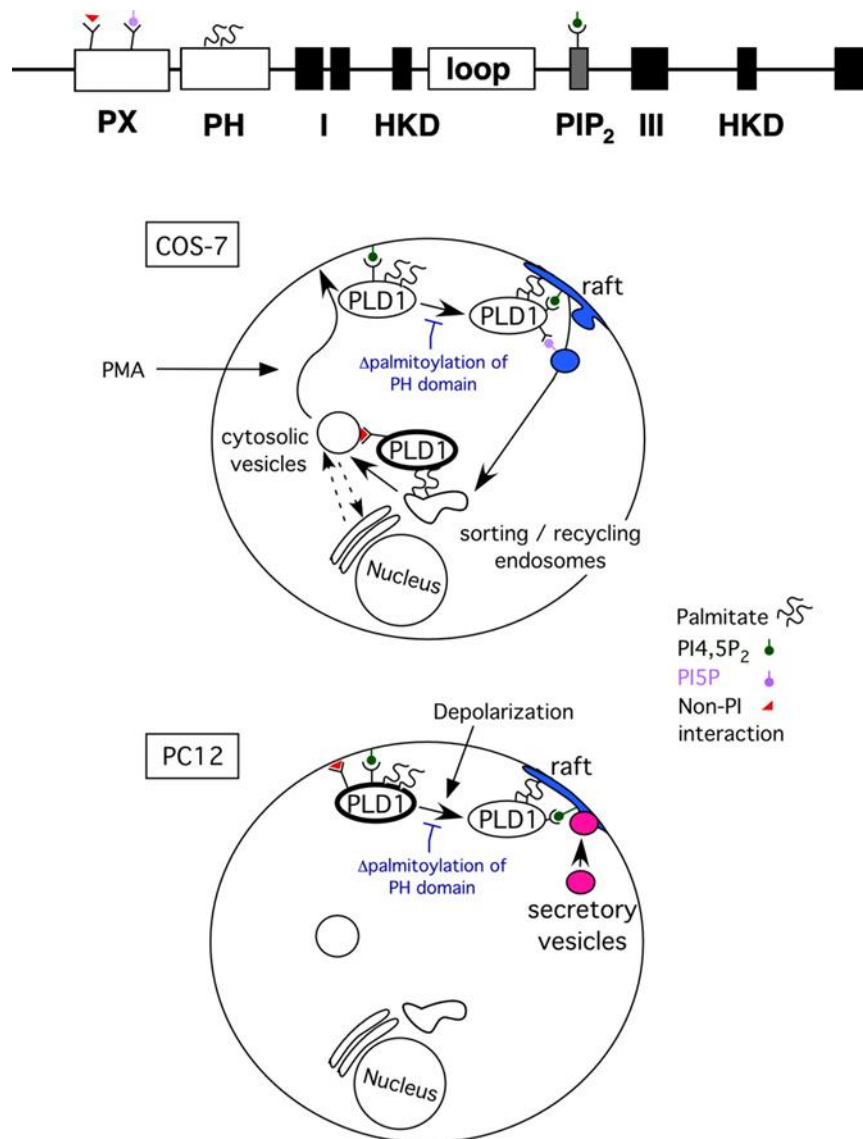


Figure 24 : Modèle illustrant les différences de localisation de la PLD1 selon le type cellulaire et son cyclage entre les compartiments membranaires
(Du et al., 2003)

Dans les cellules COS-7, la PLD1 est localisée au niveau de vésicules cytosoliques et est recrutée en périphérie suite à une stimulation, alors que dans les cellules neurosécrétrices PC12, elle est constitutivement retrouvée à la membrane plasmique et est recrutée au niveau des sites d'exocytose après une dépolarisation. Les interactions de la PLD1 avec les domaines membranaires sont médiées par certains de ses domaines régulateurs. Dans les deux cas, l'interaction du motif polybasique au niveau du cœur catalytique de la PLD avec le PI(4,5)P₂ est indispensable à sa localisation à la membrane plasmique. La localisation au niveau des microdomaines lipidiques (*rafts*) nécessite la palmitoylation de résidus du domaine PH. Dans les cellules COS-7, le domaine PX interagit en parallèle avec le PI5P des endosomes, ce qui facilite la translocation de la PLD1 sur ces vésicules.

E. Régulation de l'activité des PLD

L'activité PLD cellulaire peut être régulée en réponse à une stimulation par des signaux extracellulaires tels que certaines hormones, neurotransmetteurs ou facteurs de croissance (Exton, 2000 ; Rizzo et Romero, 2002). Un grand nombre d'agonistes sont ainsi connus comme

activateurs de la PLD, et parmi ceux-ci plusieurs agissent en se liant à des RCPG ou bien à des récepteurs tyrosine kinase (RTK). La liaison des agonistes à leurs récepteurs initie alors des voies de transduction du signal aboutissant à l'activation des PLD et à l'hydrolyse de la PC en PA au niveau du feuillet cytosolique (**figure 25A**).

La régulation intracellulaire de l'activité des PLD est complexe, mettant en jeu une multitude de régulateurs, et diffère selon le type de stimulus ou de réponse cellulaire. De nombreuses études ont tenté d'identifier les activateurs des PLD, permettant la mise en évidence du rôle clé joué entre autres par les PIP comme le PI(4,5)P₂, des protéines kinases et des petites GTPases des familles Arf, Rho et Ras dans divers processus. À l'opposé, d'autres facteurs comme certaines protéines du cytosquelette ou les céramides sont capables d'inhiber l'activité des PLD. La structure primaire des PLD nous renseigne sur les possibilités de régulation par ces protéines ou phospholipides membranaires.

Le niveau de régulation de la PLD dépend particulièrement de l'isoforme considérée. De manière générale et jusqu'à très récemment, il était admis que l'activité de la PLD2 constitue un apport plus important en PA que celle de la PLD1 dans des cellules au repos, et que ce rapport s'inverse après la stimulation des cellules. La PLD1 est en effet caractérisée par une activité basale faible qui peut être stimulée par trois classes d'effecteurs majoritaires : les protéines G de la famille Arf, celles de la famille Rho, ainsi que plusieurs protéines kinases dont la famille des PKC. Lorsque la PLD1 est stimulée simultanément par plusieurs protéines activatrices, la réponse combinée est plus importante que la somme des réponses obtenues individuellement pour chacune. Ces données suggèrent que ces différentes classes d'activateurs interagissent avec des sites de régulation allostérique de la PLD1 distincts, pouvant ainsi moduler différents paramètres cinétiques de son activité enzymatique (**Hammond et al., 1997**). Bien que tous les domaines de liaison aux régulateurs des PLD n'aient pas été déterminés précisément, des études de mutagenèse ont pu montrer notamment que la partie N-ter de la PLD est importante pour sa régulation par la PKC tandis que la partie C-ter permet la régulation par les GTPases de type Rho et Arf (**figure 25B**). De plus, l'activation synergique de la PLD1 est dépendante de la concentration de PI(4,5)P₂, lequel potentialise l'effet des différents activateurs protéiques (**Henage et al., 2006**).

Contrairement à la PLD1, la PLD2 a une activité basale élevée qui a été décrite dans un premier temps comme peu ou pas régulée par les protéines activatrices de la PLD1 (**Colley et al., 1997b ; Kodaki et Yamashita, 1997 ; Lopez et al., 1998**). Toutefois ces données ont été remises en question par plusieurs études plus récentes ayant rapporté une modulation de l'activité de la PLD2 par les protéines Arf (**Kim et al., 2003 ; Hiroshima et Exton, 2005 ; Rankovic et al., 2009**) et par Rac2 (**Peng et al., 2011**). Un certain nombre de protéines du cytosquelette inhibant la forte activité basale de la PLD2 ont également été identifiées (**Park et al., 2000 ; Lee et al., 2001 ; Chae et al., 2005**).

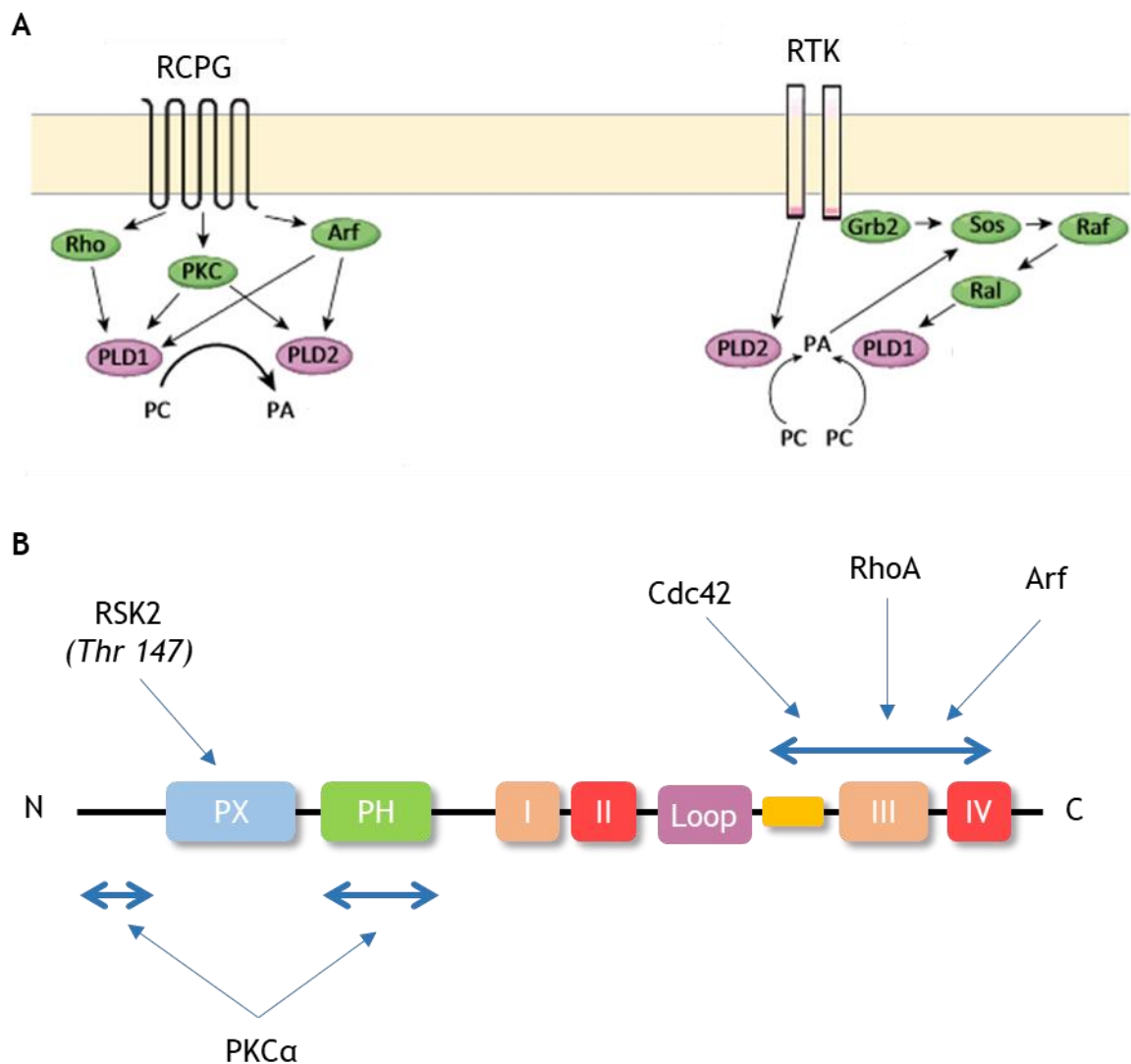


Figure 25 : Les voies d'activation des PLD1 et PLD2

A) Principales voies de signalisation cellulaires en amont de l'activation des PLD

(Adapté de Frohman, 2015)

Après la stimulation des cellules par certains agonistes ciblant des RCPG ou des RTK, plusieurs voies de transduction du signal se mettent en place, aboutissant notamment à la production de PA par les PLD1 et PLD2. Les principaux activateurs des PLD sont représentés ici : les GTPases monomériques (de type Rho, Ral et Arf), les PKC, ainsi que les RTK directement.

B) Sites de régulation identifiés sur la structure de la PLD1

La PKCα peut réguler l'activité de la PLD1 par une phosphorylation sur l'extrémité N-ter, mais également sur le domaine PH. Un site de phosphorylation par la kinase RSK2 a été décrit sur la thréonine 147 de la PLD1, qui agit sur son activité. Enfin, les GTPases des familles Rho et Arf peuvent interagir avec la PLD1 au niveau de son extrémité C-ter.

1. Effet du calcium

Des expériences réalisées *in vitro* à partir de PLD partiellement purifiée provenant de cerveau de rat ou de poumon de porc ont permis de montrer que le calcium n'est pas nécessaire

à l'activité PLD mais peut tout de même la stimuler (Taki et Kanfer, 1979 ; Okamura et Yamashita, 1994). L'implication de ce cation dans l'activation de la PLD a ensuite été montrée dans des cellules intactes, grâce à l'utilisation d'une part d'ionophores tels que l'ionomycine et l'A23187, qui permettent l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, et d'autre part de chélateurs du calcium extracellulaire ou intracellulaire, respectivement l'EGTA et le BAPTA. Dans certains modèles comme les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales MDCK ou les fibroblastes stimulés à l'EGF (*epidermal growth factor*), il existe une activité PLD indépendante du calcium (Bocckino *et al.*, 1987 ; Martin, 1988 ; Cook et Wakelam, 1992 ; Huang *et al.*, 1992). En revanche, l'ionomycine et l'A23187 stimulent la PLD dans de nombreux types cellulaires (Agwu *et al.*, 1989 ; Anthes *et al.*, 1989 ; Billah *et al.*, 1989 ; Reinhold *et al.*, 1990 ; Huang *et al.*, 1991), alors que les chélateurs de calcium inhibent l'activation de la PLD par différents agonistes (Pai *et al.*, 1988 ; Kessels *et al.*, 1991 ; Garcia *et al.*, 1992). Ces études suggèrent que la PLD peut être activée soit par la libération de calcium du RE, soit par un apport de calcium extracellulaire, ou bien par les deux mécanismes selon le type cellulaire et l'isoforme de PLD considérés.

Les PLD des mammifères n'ont aucun domaine connu permettant leur association directe au calcium (Liscovitch *et al.*, 2000). De plus, l'activité de la PLD1 recombinante est insensible à l'augmentation de la concentration de calcium *in vitro* (Hammond *et al.*, 1997). Le calcium semble ainsi activer les PLD de façon indirecte par l'intermédiaire d'autres protéines, comme la calmoduline *via* son interaction avec les GTPases Arf (Takahashi *et al.*, 1996), les isoformes de PKC dépendantes du calcium ou encore les tyrosine kinases (Earp *et al.*, 1995 ; Yu *et al.*, 1996 ; Ito *et al.*, 1997).

2. La boucle de régulation $PI(4,5)P_2$ - PA

a. Activation de la PLD par le $PI(4,5)P_2$

Les PIP sont des médiateurs importants pour la régulation de l'activité et la localisation subcellulaire des PLD, en particulier parce que leur distribution semble servir de marqueur des compartiments intracellulaires (Oude Weernink *et al.*, 2007). Comme mentionné précédemment, les activités des PLD1 et PLD2 nécessitent la présence de $PI(4,5)P_2$, pour lequel un domaine de liaison différent des domaines PH classiques a été identifié au niveau du site actif de ces enzymes (Colley *et al.*, 1997a ; Hammond *et al.*, 1997 ; Sciorra *et al.*, 1999). Les premières expériences visant à étudier l'importance du $PI(4,5)P_2$ dans l'activation de la PLD ont été réalisées sur des vésicules artificielles de PC/PE $\pm PI(4,5)P_2$ mises en présence de PLD recombinante ou purifiée à partir de cerveau de rat par exemple. Ces études ont permis de constater que le $PI(4,5)P_2$ est un cofacteur nécessaire à l'effet stimulant de la PKC et des petites protéines G des familles Arf et Rho sur la PLD (Brown *et al.*, 1993 ; Liscovitch *et al.*, 1994 ; Massenburg *et al.*, 1994 ; Brown *et al.*, 1995 ; Kuribara *et al.*, 1995 ; Ohguchi *et al.*, 1996 ; Hammond *et al.*, 1997). La stimulation de la

PLD par le PI(4,5)P₂ a été observée de façon dose-dépendante, alors que le PI, le PA et la PS ne semblent pas avoir d'effet sur l'activité de la PLD. Dans les cellules U937, le blocage de la synthèse de PI(4,5)P₂ grâce à des anticorps dirigés contre la PI4P5K inhibe complètement l'activité PLD stimulable par le GTPγS (Pertile *et al.*, 1995). De même, l'utilisation de la néomycine, un antibiotique capable de fixer le PI(4,5)P₂ avec une grande affinité, entraîne une inhibition de l'activité PLD dans les cellules neuronales, les cellules HL60 et les neutrophiles (Liscovitch *et al.*, 1991 ; Geny et Cockcroft, 1992 ; Ohguchi *et al.*, 1996).

b. Activation de la PI4P5K par le PA

De façon intéressante, le PA produit par la PLD est capable de réguler positivement la production de PI(4,5)P₂ en activant la PI4P5K, l'une des enzymes responsables de la production de ce phosphoinositide. Il existe trois isoformes de PI4P5K chez les mammifères (α , β et γ), qui ont été retrouvées localisées dans la membrane plasmique, au niveau de protrusions membranaires appelées « *ruffles* » et des adhésions focales, mais aussi sur des compartiments membranaires intracellulaires tels que l'appareil de Golgi, les lysosomes et le noyau (Hinchliffe *et al.*, 1998). Plusieurs études ont montré que les PI4P5K sont activées par le PA *in vitro* et *in vivo* (Divecha *et al.*, 2000 ; Jones *et al.*, 2000). Cet effet est obtenu aussi bien avec du PA exogène qu'avec du PA endogène formé par la PLD (Moritz *et al.*, 1992). De plus, le PA stimule spécifiquement la PI4P5K par rapport à la PI5P 4-kinase (PI5P4K), une PIP kinase de type II qui catalyse la production de PI(4,5)P₂ à partir du PI5P. Cette activation est médiée par une liaison du PA sur l'extrémité C-ter de la PI4P5K, qui augmente ainsi son affinité pour son substrat (Jenkins *et al.*, 1994 ; Ktistakis *et al.*, 2003). Ainsi, la synthèse de PI(4,5)P₂ est amplifiée après l'activation de la PLD par Arf et la formation de PA dans les membranes des cellules HL60 (Fensome *et al.*, 1996). À l'inverse, l'inhibition de la PLD avec des alcools primaires bloque la synthèse de PI(4,5)P₂ dans les membranes lysosomales, suggérant un contrôle de la production de ce lipide par le PA (Arneson *et al.*, 1999). Il est aussi important de noter que les PLD1 et PLD2 semblent interagir directement avec la PI4P5K. La PLD2 est notamment capable de recruter cette kinase à la membrane (Divecha *et al.*, 2000). L'activité de la PI4P5K peut également être stimulée par les GTPases Arf et notamment Arf6, un des activateurs principaux de la PLD (Honda *et al.*, 1999 ; Jones *et al.*, 1999 ; Perez-Mansilla *et al.*, 2006).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de PI(4,5)P₂ stimulant à son tour la PLD, il existe alors une étroite relation entre la PLD, la PI4P5K et leurs produits respectifs. Il semble que la PLD et ses régulateurs protéiques puissent agir dans une boucle de rétrocontrôle positif pour activer la PI4P5K, afin de produire du PI(4,5)P₂ à la membrane plasmique qui lui-même va augmenter l'activité PLD. Ce dispositif d'amplification, permettant une accumulation localisée massive de PA et PI(4,5)P₂, pourrait jouer un rôle physiologique important. Par ailleurs, la production de PI(4,5)P₂ par la PI4P5K a été impliquée dans l'exocytose, la phagocytose, et la

régulation du cytosquelette d'actine (Hinchliffe *et al.*, 1998). Ces fonctions cellulaires étant également régulées par le PA, cela amène à penser que ce dernier puisse en partie agir de manière indirecte en tant que cofacteur de la PI4P5K.

3. Protéines kinases

Les kinases sont des enzymes capables d'utiliser l'ATP pour phosphoryler les résidus tyrosines de certaines protéines, ou bien les résidus sérines/thréonines dans le cas de la famille des PKC. Ces phosphorylations provoquent des modifications des protéines cibles impliquées dans la transduction des signaux, en induisant un changement de leur conformation.

a. La famille des PKC

Les PKC sont des sérine/thréonine kinases, qui possèdent un domaine de liaison avec les lipides acides tels que la PS (Hug et Sarre, 1993). Les isoformes de PKC peuvent être divisées en trois sous-familles selon leur mode d'activation : les PKC conventionnelles (α , β et γ) activables par le calcium, le DAG et la PS ; les PKC nouvelles (δ , ϵ , η , θ) activables par le DAG et la PS mais indépendantes du calcium ; et les PKC atypiques (ζ , λ , et ι) activables seulement par la PS.

L'activation de la PLD par les PKC a été démontrée dans de nombreux types cellulaires, dans un premier temps en utilisant des esters de phorbol tels que le PMA (*phorbol myristate acetate*), un activateur classique des PKC conventionnelles et nouvelles. Le PMA agit selon un mécanisme similaire au DAG, en entraînant la translocation membranaire des PKC. Cependant, un traitement prolongé par le PMA provoque la dégradation des PKC selon un mécanisme de rétrocontrôle négatif (Lopez *et al.*, 1995). Le lien entre la PLD1 et la PKC a été établi par le fait que la stimulation avec le PMA de cellules COS-7 surexprimant la PLD1 augmente l'activité PLD (Colley *et al.*, 1997b). De plus, des expériences d'immunoprécipitation ont permis de constater que le traitement de fibroblastes NIH 3T3 par le PMA induit l'association de la PLD1 avec la PKC α (Lee *et al.*, 1997a). La dégradation des PKC suite à un traitement prolongé des cellules avec le PMA a pour effet de supprimer la capacité de divers agonistes à stimuler la PLD. Néanmoins, dans certains cas, le rétrocontrôle négatif des PKC ne provoque qu'une inhibition incomplète voire nulle de la stimulation de la PLD, ce qui a suggéré la présence de régulateurs de l'activité PLD indépendants des PKC (Exton, 1997).

D'autres approches ont validé ensuite ces premières observations. L'utilisation d'inhibiteurs des PKC par exemple (Davis *et al.*, 1989) bloque partiellement ou totalement l'activation de la PLD par certains agonistes (Bosch *et al.*, 1999 ; Khan et Hichami, 1999 ; Slaaby *et al.*, 2000). Des expériences ont également permis de définir les rôles spécifiques des PKC α et β dans l'activation des PLD. La surexpression de ces deux isoformes dans des fibroblastes augmente l'activité PLD basale ainsi que l'activité stimulée par l'endothéline, la thrombine et le PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Pai *et al.*, 1991 ; Pachter *et al.*, 1992 ; Eldar *et al.*, 1993). À

l'inverse, l'altération de l'expression de la PKC α par des ARN interférents dans les cellules MDCK diminue l'activation de la PLD par les agonistes purinergiques (Balboa *et al.*, 1994). Cette activation de la PLD1 par une PKC est synergique avec celle induite par les petites protéines G (Singer *et al.*, 1996 ; Hammond *et al.*, 1997) et par le PI(4,5)P₂ (Ohguchi *et al.*, 1996). Tous ces résultats indiquent donc que les PKC α et β jouent un rôle important dans la régulation de l'activité PLD. Cependant, le mécanisme d'activation des PLD par les PKC est longtemps resté débattu.

En effet, certaines études ont indiqué que les PKC phosphorylent directement la PLD1 *in vivo*, sur des résidus identifiés, et que ces phosphorylations régulent l'activité de la PLD1 (Kim *et al.*, 1999, 2000). La stimulation par le PMA ou l'EGF induit notamment la phosphorylation de PLD1 retrouvée au niveau des microdomaines lipidiques de la membrane plasmique, où elle forme un complexe avec la cavéoline-1 et le récepteur à l'EGF (EGFR). La mutation des sites de phosphorylation réduit l'activité PLD en réponse à l'EGF (Han *et al.*, 2002). Néanmoins, plusieurs études réalisées en parallèle ont montré que l'activation de la PLD1 après ajout de PMA est indépendante de l'activité kinase de la PKC α , puisqu'elle se produit également *in vitro* en l'absence d'ATP (Singer *et al.*, 1995 ; Hammond *et al.*, 1997 ; Min *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de PKC comme la staurosporine ne bloque que partiellement l'activation de la PLD par certains agonistes (Bosch *et al.*, 1999 ; Khan et Hichami, 1999 ; Slaaby *et al.*, 2000). De façon intéressante, le domaine régulateur de la PKC est capable à lui seul de stimuler la PLD (Singer *et al.*, 1996). De nombreux résultats suggèrent ainsi que l'interaction directe entre la PKC α et la PLD1 soit suffisante pour activer cette dernière (Colley *et al.*, 1997a ; Min et Exton, 1998 ; Kim *et al.*, 1999).

En accord avec ce modèle, des études ont montré par la suite que l'augmentation rapide de l'activité de la PLD1 en réponse au PMA est corrélée avec l'augmentation de l'interaction PLD1-PKC α , et que la phosphorylation de la PLD1 par la PKC n'a lieu que plus tardivement (Hu et Exton, 2003 ; Becker et Hannun, 2005 ; Kook et Exton, 2005). En outre, la surexpression d'un mutant dominant négatif de la PKC α , localisé majoritairement à la membrane plasmique, stimule l'activité PLD plus fortement que la forme sauvage. Le traitement des cellules COS-7 avec la staurosporine réduit partiellement l'interaction entre PLD1 et la PKC induite par le PMA, ce qui peut expliquer la diminution de l'activité PLD en présence de ce type d'inhibiteurs (Hu et Exton, 2003). Cet effet pourrait également être expliqué par une action indirecte sur la phosphorylation d'autres régulateurs de la PLD1 par la PKC. Par exemple, la PKC phosphoryle et inhibe Ras-GAP, conduisant à une activation de Ras qui active d'autres GTPases régulatrices de la PLD1 (Colley *et al.*, 1997b).

Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la PLD1 interagit directement avec la PKC α *via* son domaine N-ter (Xie *et al.*, 1998), mais en amont des domaines PH et PX (Hammond *et al.*, 1997 ; Sung *et al.*, 1999a). Les mutants de PLD1 délétés de leur extrémité N-ter ne voient pas leur activité augmenter après une stimulation aux esters de phorbol (Hodgkin *et al.*, 1999 ;

Sugars *et al.*, 1999). Cependant des travaux plus récents ont montré que la PKC α peut réguler l'activité de la PLD1 en interagissant avec son domaine PH, ainsi qu'avec son extrémité C-ter au niveau du résidu F663 (Kook et Exton, 2005 ; Hu et Exton, 2005). Du fait de ces différentes interactions, la PKC semble induire un changement conformationnel de la PLD1, favorisant l'accès de la PC au niveau de son domaine catalytique (Henage *et al.*, 2006).

La PLD2 quant à elle a été initialement décrite comme insensible aux PKC (Colley *et al.*, 1997b ; Kodaki et Yamashita, 1997). Cependant, quelques années plus tard, plusieurs études ont décrit une activation de PLD2 en réponse au PMA, quoique d'une amplitude plus faible que celle observée pour PLD1 (Siddiqi *et al.*, 2000 ; Han *et al.*, 2002 ; Chen et Exton, 2004). Dans les cellules PC12, la surexpression d'un mutant de PKC δ dépourvu d'activité kinase ou l'inhibition spécifique de cette isoforme suppriment l'activation et la phosphorylation de PLD2 par les esters de phorbol. Dans ce cas, l'activation de PLD2 par la PKC δ se fait très probablement *via* une phosphorylation directe (Han *et al.*, 2002). Des expériences ont pu également montrer que la PKC α interagit *in vivo* avec la PLD2 et l'active suite à une stimulation par le PMA. Cette activation est accompagnée d'une phosphorylation de la PLD2 qui contribue à désactiver l'enzyme, indiquant que l'activation de la PLD2 par la PKC α soit médiée par une interaction protéine-protéine (Chen et Exton, 2004).

b. La protéine RSK2

Parmi les sérine/thréonine kinases qui régulent l'activité PLD, les PKC sont les plus étudiées et les plus ubiquitaires. D'autres enzymes avec cette activité sont retrouvées fortement exprimées dans des tissus plus spécifiques, telles que les membres de la famille RSK (*Ribosomal S6 kinase*). En effet, le résidu Thr-147 sur le domaine PX de la PLD1, connu pour être phosphorylé par la PKC, se trouve également dans une séquence consensus de phosphorylation pour l'isoforme RSK2. Cette dernière est phosphorylée et activée par ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase*) en réponse à une stimulation extracellulaire par des facteurs de croissance, ainsi que certaines hormones et neurotransmetteurs. *Via* son activité kinase sur différents substrats cytosoliques et nucléaires, la protéine RSK2 est impliquée dans différents processus cellulaires tels que la transcription, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Hauge et Frödin, 2006).

Cette kinase est particulièrement exprimée dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet, et a une fonction extrêmement importante dans le développement du système nerveux (Zeniou *et al.*, 2002). En effet, chez l'homme, des mutations du gène codant la protéine RSK2 ont été identifiées chez des patients souffrant du syndrome de Coffin-Lowry (CLS). Cette pathologie se caractérise par un retard mental, des troubles du développement psychomoteur, ainsi que des malformations squelettiques et un retard de croissance (Trivier *et al.*, 1996 ; Pereira *et al.*, 2010). Des analyses post-mortem ont permis de mettre à jour des défauts structuraux au niveau du cerveau de patients atteints de CLS, à savoir une réduction du volume total de plusieurs structures

de l'encéphale corrélée à une perte de neurones et une prolifération anormale des cellules gliales dans le cortex cérébral et le cervelet (Kesler *et al.*, 2007). L'ensemble de ces symptômes cliniques laisse entrevoir une altération profonde des mécanismes de sécrétion hormonale et de libération des neurotransmetteurs au cours de la mise en place du système nerveux central. Les travaux de notre équipe ont permis de montrer que la PLD1 est phosphorylée sur la Thr 147 et activée par la kinase RSK2 dans un modèle de cellules neurosécrétrices, les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale, et que cette régulation joue un rôle majeur dans la libération des hormones et des neurotransmetteurs (Zeniou-Meyer *et al.*, 2008). Par ailleurs, des neurones en culture issus de souris *Pld1*^{-/-} et *Rsk2*^{-/-} présentent les mêmes caractéristiques en termes de retard de développement. La phosphorylation de la PLD1 par RSK2 semble jouer un rôle important dans la synthèse de PA et la fusion des vésicules VAMP7 positives au niveau du cône de croissance de l'axone (Ammar *et al.*, 2013).

c. Tyrosines kinases

Dans différents types cellulaires, la PLD est activée par phosphorylation suite à la liaison de facteurs de croissance comme l'EGF et le PDGF sur leurs récepteurs, qui possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque (Cockcroft, 1997) ou bien dans certains cas *via* des récepteurs qui recrutent des tyrosines kinases cytosoliques une fois activés (Jiang *et al.*, 1994). De nombreux travaux basés sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de tyrosines kinases ou de tyrosines phosphatases ont démontré l'existence d'une régulation de la PLD par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation sur les résidus tyrosine (Bourgoin et Grinstein, 1992 ; Dubyak *et al.*, 1993 ; Briscoe *et al.*, 1995 ; Natarajan *et al.*, 1996 ; Min *et al.*, 1998). Cependant, les enzymes responsables de ces phosphorylations restent largement inconnues à ce jour, mis à part les RTK. L'activation de l'EGFR entraîne ainsi la phosphorylation de la PLD2 associée au récepteur et la formation de PA, qui peut ensuite recruter des effecteurs (Di Fulvio *et al.*, 2008).

4. Petites protéines G (GTPases monomériques)

Les GTPases ou protéines G sont caractérisées par un motif d'association aux nucléotides GDP (guanosine diphosphate) ou GTP, qui contrôlent leur activité. Ces protéines sont des interrupteurs moléculaires, dans le sens où elles ont la capacité de stimuler ou inhiber une cascade de signalisation en cyclant entre une forme active (liée au GTP) pouvant interagir avec ses effecteurs et une forme inactive (liée au GDP). Il existe deux grandes classes de GTPases : i) les GTPases hétérotrimériques constituées des sous-unités α , β et γ , et ii) les petites GTPases monomériques de 20-30 kDa. Le cycle de ces dernières est régulé par deux grandes classes de protéines, les facteurs d'échange GEF (*guanine nucleotide-exchange factor*) et les protéines activatrices GAP (*GTPase activating protein*) (figure 26). Ainsi, les GEF activent les petites GTPases en les liant au GTP au détriment du GDP, alors que les GAP les inactivent en favorisant leur activité d'hydrolyse du GTP en GDP (Cherfils et Zeghouf, 2013). Un troisième type de

régulateur, le GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*), empêche la dissociation du GDP avec certaines familles de petites protéines G. Il est possible de favoriser l'activation de ces enzymes grâce à l'utilisation du GTP γ S, un analogue structural du GTP qui se lie aux GTPases, mais dont la cinétique d'hydrolyse est extrêmement lente comparée au GTP. Les GTPases monomériques représentent une superfamille regroupant plus de 100 membres qui régulent un grand nombre de fonctions cellulaires. Cette superfamille se subdivise en 5 familles en fonction de l'homologie de séquence des protéines : Rho, Ras, Rab, Arf et Ran (Takai *et al.*, 2001).

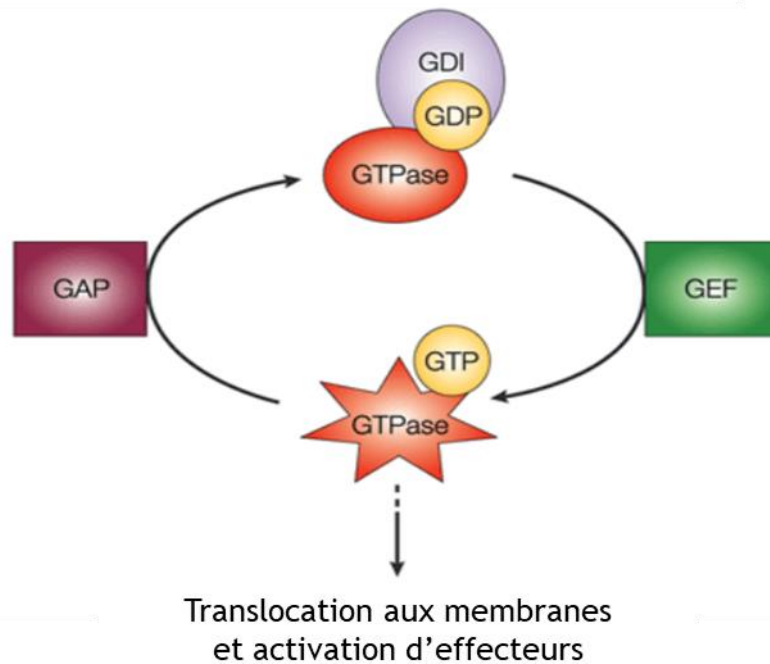


Figure 26 : Cycle d'activation des petites protéines G

(Adapté de Coleman *et al.*, 2004)

Les GTPases monomériques alternent entre une forme cytosolique inactive liée au GDP et une forme membranaire active liée au GTP. Le passage d'une forme à l'autre est contrôlé par des régulateurs de ces GTPases. Les GEF favorisent l'échange du GDP par le GTP, tandis que les GAP catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP. Dans certains cas, les GTPases liées au GDP sont maintenues dans le cytosol par une association aux GDI. Une fois activées, les GTPases monomériques seront recrutées au niveau des membranes, où elles pourront activer des effecteurs et permettre ainsi la transduction du signal.

L'utilisation du GTP γ S entraîne une stimulation de l'activité PLD dans des systèmes acellulaires ou des cellules perméabilisées, suggérant une régulation de la PLD par des GTPases. Par la suite, de nombreuses études ont montré que la PLD1 est activée par les petites protéines G des familles Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42), Ras (Ral), et Arf (Arf1-6) dans divers contextes cellulaires (Hammond *et al.*, 1995 ; Hammond *et al.*, 1997 ; Hodgkin *et al.*, 1999). Parmi leurs multiples fonctions cellulaires, ces GTPases sont notamment impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et les événements de trafic vésiculaire (Exton, 1999 ; Oude Weernink *et al.*, 2007). L'implication de chaque GTPase dans la régulation de la PLD1 est dépendante du type

cellulaire et également de la voie de transduction du signal. Les travaux de notre équipe ont notamment montré que les GTPases Arf6, RalA et Rac1 coopèrent pour permettre l'activation optimale de la PLD1 au cours de l'exocytose dans les cellules chromaffines (Bader et Vitale, 2009). Ces GTPases potentialisent ainsi l'activité de la PLD1 par une interaction allostérique, qui contrairement à la PKC ne dépend pas de l'extrémité N-ter puisqu'une PLD1 tronquée en N-ter est toujours activable par les protéines Arf1-6, RhoA, Rac1 et Cdc42. Il semble en revanche que les sites d'interaction de ces GTPases se situent au niveau de l'extrémité C-ter de la PLD1 (Sung *et al.*, 1999a ; Zhang *et al.*, 1999).

a. Les GTPases Rho

La famille des GTPases Rho est divisée en trois groupes principaux : Rho, Rac et Cdc42-like (Bishop et Hall, 2000). Celles-ci sont indirectement activées suite à la fixation de nombreux agonistes dont le LPA, l'endothéline-1, la trombine et l'insuline sur leurs récepteurs. Cette liaison induit la transduction du signal en impliquant notamment les sous-unités α et $\beta\gamma$ de protéines G hétérotrimériques, qui activent les GEF spécifiques des Rho (Exton, 1999). Les GTPases Rho sont reliées par leur extrémité C-ter aux GDI qui les maintiennent sous forme inactive dans le cytosol. Lors de leur activation par des GEF, elles sont recrutées aux membranes où elles peuvent activer leurs effecteurs protéiques. Une fois activées, la majorité de ces protéines G sont situées au niveau de la membrane plasmique, mais on les retrouve également sur d'autres compartiments tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries, ou encore les endosomes (Ridley, 2006).

Les GTPases Rho contrôlent une multitude de phénomènes biologiques incluant le cycle cellulaire et la motilité des cellules (Hill *et al.*, 1995 ; Fukuhara *et al.*, 1999). De plus, ce sont des régulateurs clés du trafic membranaire et surtout de la dynamique du cytosquelette (Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997 ; Frohman *et al.*, 1999). Les trois formes principales de ces GTPases Rho sont des éléments modulateurs du cytosquelette d'actine, de différentes façons : RhoA est impliquée dans la formation de fibres de stress (Nobes et Hall, 1995), Rac1 est responsable de la formation des lamellipodes (Ridley *et al.*, 1992), et Cdc42 est responsable de la formation des filopodes (Kozma *et al.*, 1995 ; Nobes et Hall, 1995). Le mécanisme moléculaire par lequel ces protéines Rho induit le réarrangement du cytosquelette d'actine n'est pas complètement connu. Plusieurs effecteurs de Rho ont été identifiés chez les mammifères dont la Rho kinase (ROCK), le complexe Arp2/3, les formines (P140mDia), mais également la PLD (Madaule *et al.*, 1995 ; Reid *et al.*, 1996 ; Watanabe *et al.*, 1996 ; Bishop et Hall, 2000).

Des études réalisées au début des années 1990 ont permis pour la première fois de mettre en évidence une régulation de la PLD par les protéines de la famille Rho. Les auteurs ont montré que l'effet activateur du GTP γ S sur la PLD dans des membranes de neutrophiles est inhibé par RhoGDI, un inhibiteur spécifique de la dissociation du GDP des protéines Rho (Olson *et al.*, 1991 ; Bowman *et al.*, 1993). À la suite de cela, de nombreuses expériences *in vitro* ont permis d'identifier

les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 en tant qu'activateurs de la PLD1 (Hammond *et al.*, 1997 ; Min et Exton, 1998 ; Hodgkin *et al.*, 1999). En revanche, aucune activation directe de la PLD2 par les protéines Rho n'avait pu être observée jusqu'à une étude relativement récente rapportant l'interaction de cette isoforme avec la protéine Rac2 (Peng *et al.*, 2011). L'activation de la PLD1 par les agonistes activant les protéines Rho est associée à la translocation de ces protéines vers les membranes. Des études utilisant des fractions membranaires de nombreux types cellulaires ou des préparations de PLD partiellement purifiée ont montré que RhoA était la protéine de la famille Rho la plus efficace sur la PLD1 (Malcolm *et al.*, 1994 ; Balboa et Insel, 1995 ; Kwak *et al.*, 1995 ; Siddiqi *et al.*, 1995 ; Singer *et al.*, 1995 ; Provost *et al.*, 1996). Différentes toxines bactériennes bloquant la translocation membranaire des protéines Rho ont été utilisées pour confirmer l'implication de ces protéines dans l'activation de la PLD *in cellulo*. Par exemple, la toxine C3 de *Clostridium botulinum*, qui maintient RhoA sous forme inactive *via* une ADP-ribosylation, empêche l'activation de la PLD suite à la stimulation des fibroblastes par divers agonistes (Malcolm *et al.*, 1996 ; Hess *et al.*, 1997 ; Ohguchi *et al.*, 1997). De la même manière, la toxine B issue de *Clostridium difficile*, qui inactive les protéines Rho par glucosylation, bloque l'activation de la PLD induite par la stimulation de récepteurs muscariniques dans des cellules embryonnaires de rein (Schmidt *et al.*, 1995). L'activation de la PLD pourrait également être médiée de façon indirecte par l'effet activateur de RhoA ou Rac1 sur la PI4P5K et donc sur le niveau de PI(4,5)P₂ (Chong *et al.*, 1994 ; Hartwig *et al.*, 1995 ; Ren *et al.*, 1996). Or ce phosphoinositide étant un important cofacteur pour l'activité des PLD1 et 2, les changements d'activité PLD peuvent en partie être dus à des variations des niveaux de PI(4,5)P₂ dans les membranes (Schmidt *et al.*, 1996).

La caractérisation du site de liaison à la protéine RhoA au niveau de la PLD1 montre une interaction directe entre ces deux protéines (Yamazaki *et al.*, 1999 ; Du *et al.*, 2000). Le domaine d'interaction avec RhoA se situe à l'extrémité C-ter de la PLD1, sur une séquence riche en résidus basiques entre les acides aminés 873 à 1024 (Cai et Exton, 2001 ; Exton, 2002). La combinaison des trois protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 n'active pas plus la PLD qu'une protéine seule, ce qui suggère qu'elles interagissent avec la PLD sur le même site. Cependant, l'action des Rho GTPases sur la PLD est synergique avec celle d'autres facteurs cytosoliques tels que la PKC α et les protéines de la famille Arf (Kwak *et al.*, 1995 ; Singer *et al.*, 1996 ; Exton, 1997 ; Hammond *et al.*, 1997).

b. Les GTPases RalA et RalB

Les protéines RalA et RalB partagent 85% d'identité et font partie de la superfamille des GTPases Ras, connues pour être des proto-oncogènes. L'activation de RalA et RalB est régulée par des GEF comme Ral-GDS, principalement dépendantes de voies de signalisation impliquant la protéine Ras (Feig, 2003). Suite à l'activation de RTK ou de RCPG, la protéine Ras présente au niveau de la membrane plasmique peut recruter et activer Ral-GDS, par une interaction directe

(White *et al.*, 1996). Cela entraîne ainsi la translocation membranaire et l'activation de RalA et RalB par Ral-GDS (Kishida *et al.*, 1997 ; Matsubara *et al.*, 1999). Une voie supplémentaire de régulation des Ral fait intervenir la calmoduline et l'activation par le calcium, par exemple dans des neutrophiles après stimulation au fMLP (*N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*), un peptide chimiotactique (Wang *et al.*, 1997 ; M'Rabet *et al.*, 1999).

Tout comme les GTPases Rho, les protéines Ral sont également impliquées dans le trafic membranaire et le réarrangement du cytosquelette d'actine (van Dam et Robinson, 2006). Elles jouent un rôle en particulier dans l'exocytose de vésicules synaptiques (Polzin *et al.*, 2002) ou encore l'endocytose de récepteurs (Nakashima *et al.*, 1999 ; Jullien-Flores *et al.*, 2000). La localisation de Ral est dynamique, puisqu'elle peut cycloser entre la membrane plasmique et des compartiments vésiculaires intracellulaires comme des vésicules synaptiques (Ngsee *et al.*, 1991) ou encore des granules denses de plaquettes humaines (Mark *et al.*, 1996). Le rôle de Ral dans les phénomènes de trafic vésiculaire est principalement lié à son interaction avec deux membres de l'exocyste, un complexe de 8 protéines jouant un rôle dans le recrutement et l'arrimage de vésicules au niveau de sites d'exocytose (Kee *et al.*, 1997 ; Brymora *et al.*, 2001 ; Moskalenko *et al.*, 2002 ; Polzin *et al.*, 2002).

En dehors des protéines de l'exocyste, les PLD sont également des effecteurs des protéines Ral. Dans divers types cellulaires, l'interaction de la PLD1 avec RalA potentialise l'activation de cette isoforme par les GTPases Arf1 et Arf6, qui interagissent avec la PLD1 sur un site distinct de celui des protéines Ral (Luo *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 1998). Des travaux de notre équipe ont notamment montré que la protéine RalA régule avec Arf6 la capacité de la PLD1 à promouvoir l'exocytose dans les cellules neurosécrétrices (Vitale *et al.*, 2005) et interagit directement avec les deux isoformes PLD1 et PLD2 au moment de la formation des phagosomes dans les macrophages RAW 264.7 (Corrotte *et al.*, 2010).

c. Les GTPases de la famille Arf

Les membres de la famille Arf ont été initialement identifiés par leur capacité à stimuler l'ADP-ribosylation des protéines G hétérotrimériques Gs, induite par la toxine cholérique (Kahn et Gilman, 1986 ; Lambeth *et al.*, 1995). Les 6 GTPases de cette famille ont été regroupées, selon leur structure, en trois classes : la classe I incluant les isoformes Arf1-3, la classe II contenant Arf 4-5, et la classe III comportant seulement Arf6 (Moss et Vaughan, 1998 ; Chavrier et Goud, 1999). L'activation des protéines Arf a lieu suite à la liaison d'un ligand sur un RCPG ou un RTK, mais les voies de signalisation déclenchées ne sont pas toujours totalement comprises. Les protéines Arf sont activées par des GEF et inhibées par des GAP, mais elles ne dépendent pas des GDI. Comme les autres GTPases monomériques, les protéines Arf sont généralement cytosoliques et leur activation par des GEF permet leur translocation au niveau de différents compartiments membranaires où elles peuvent recruter un certain nombre de protéines cibles.

Les GEF des protéines Arf possèdent un domaine catalytique de 200 résidus nommé domaine Sec7 (Chardin *et al.*, 1996). Elles sont regroupées en deux classes selon leur poids moléculaire (PM) : les facteurs de haut PM (BIG1/2, Gea1) et les facteurs de faible PM (cytohésines et protéines de la famille EFA6). L'implication des GEF de haut PM dans la régulation des protéines Arf a pu être définie grâce à l'utilisation d'une toxine fongique, la bréfeldine A. Cette molécule inhibe l'activation des Arf en ciblant le domaine Sec7 des GEF de haut PM uniquement (Donaldson *et al.*, 1992 ; Mansour *et al.*, 1999 ; Peyroche *et al.*, 1999). Il a été démontré par exemple que l'application de cette drogue diminue la sécrétion en inhibant l'activation d'Arf1 (Misumi *et al.*, 1986). À la différence des GEF de haut PM qui sont plutôt localisées sur l'appareil de Golgi, celles de faible PM semblent intervenir préférentiellement à la membrane plasmique et dans des structures endosomales (Donaldson et Jackson, 2000). Parmi cette classe, on trouve la cytohésine-2 ou ARNO (*Arf nucleotide-binding site opener*), spécifique de l'activation d'Arf1 et Arf6 (Paris *et al.*, 1997). Toutes les GEF de la famille des cytohésines telle ARNO contiennent un domaine PH qui sous-tend la localisation membranaire *via* une interaction avec des PIP spécifiques, ainsi qu'un domaine polybasique adjacent qui renforce l'association avec la membrane. L'association d'ARNO à la membrane plasmique et sa capacité à activer les protéines Arf dépend ainsi de sa liaison au PI(4,5)P₂. Par ailleurs, le recrutement membranaire d'ARNO est régulé négativement par la phosphorylation d'un résidu sérine par la PKC au sein du domaine polybasique (Santy *et al.*, 1999). Parmi les GAP connues des protéines Arf, les protéines GIT et ACAP constituent deux sous-groupes ciblant Arf6 (Donaldson et Jackson, 2000).

La famille des protéines Arf joue un rôle important à la fois dans la régulation de la dynamique d'actine, dans la modification de la composition lipidique de la membrane ainsi que dans le trafic vésiculaire (Moss et Vaughan, 1998 ; Roth *et al.*, 1999 ; Jaworski, 2007). Ces GTPases ont notamment été impliquées de façon importante dans les processus de trafic membranaire (D'Souza-Schorey *et al.*, 1995 ; Radhakrishna et Donaldson, 1997 ; D'Souza-Schorey *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Altschuler *et al.*, 1999 ; Bader *et al.*, 2004). Les protéines de la classe I (Arf1-3) sont impliquées dans le trafic intracellulaire entre le Golgi et le RE. L'isoforme la plus étudiée de cette classe est Arf1, qui est recrutée au niveau de l'appareil de Golgi lorsqu'elle est liée au GTP. L'activité de cette GTPase est indispensable à la régulation de la structure et la fonction de cet organite. De plus, de fortes concentrations de bréfeldine A affectent de manière très prononcée la morphologie de l'appareil de Golgi, indiquant que l'activation d'Arf1 à ce niveau requiert des GEF de haut PM (Rümenapp *et al.*, 1995 ; Mitchell *et al.*, 1998). Une fois activée, Arf1 intervient dans la sécrétion en recrutant notamment le coatomère COPI au niveau du CGN, ainsi que des protéines adaptatrices (AP1, AP3, et AP4) et la protéine GGA au niveau du TGN et des membranes endosomales (Bonifacino et Glick, 2004). Les protéines de la classe II (Arf 4-5) sont impliquées dans le transport au sein du Golgi, mais leur fonction reste peu étudiée. Arf5 semble par exemple affecter l'association de GGA au niveau du TGN (Takatsu *et al.*, 2002). Enfin, la protéine Arf6 est

celle dont les fonctions sont les mieux connues et semblent les plus diverses. Dans la plupart des types cellulaires, Arf6-GTP est localisée à la membrane plasmique ou au niveau de divers compartiments endosomaux et intervient dans de nombreux processus tels que la cytokinèse, le trafic vésiculaire, ainsi que la dynamique de l'actine (Donaldson, 2003 ; D'Souza-Schorey et Chavrier, 2006).

Contrairement aux autres GTPases monomériques, les protéines Arf présentent une hélice amphipathique en région N-ter, ainsi qu'une myristoylation sur la glycine en position 2 (Gillingham et Munro, 2007). Cette modification lipidique est requise pour l'association à la membrane ainsi que pour les fonctions biologiques des protéines Arf (Brown *et al.*, 1993 ; Amor *et al.*, 1994 ; Brown *et al.*, 1995). Par ailleurs, la présence de l'hélice amphipathique rapproche les GTPases Arf de la membrane et implique que les effecteurs des protéines Arf soient restreints à la surface de la bicouche. Ceci explique certainement en partie le fait que ces protéines effectrices soient souvent des protéines de revêtement ou des enzymes impliquées dans des modifications lipidiques qui peuvent déformer la surface de la bicouche lipidique (Gillingham et Munro, 2007). Les effecteurs connus des protéines Arf comprennent des protéines de manteau, la protéine golgienne GGA, Rac1, la PI4P5K et la PLD (Donaldson et Honda, 2005).

Les GTPases de la famille Arf ont été les premiers facteurs identifiés comme activateurs des PLD sensibles au GTP γ S, à partir des cellules HL60 et de cerveau de porc (Anthes *et al.*, 1991 ; Brown *et al.*, 1993, 1995). L'activation de la PLD1 recombinante par les protéines Arf en présence de GTP γ S est très élevée en comparaison de celle observée pour les protéines Rho (Hammond *et al.*, 1997 ; Hodgkin *et al.*, 1999). Les isoformes Arf1, Arf3, Arf5 et Arf6 ont été décrites comme capables de stimuler l'activité PLD dans divers types cellulaires (Cockcroft *et al.*, 1994 ; Massenburg *et al.*, 1994 ; Caumont *et al.*, 1998). Les deux variants d'épissage PLD1a et PLD1b sont activables par Arf chez l'humain et le rat (Hammond *et al.*, 1995, 1997 ; Park *et al.*, 1997 ; Min *et al.*, 1998). Les protéines Arf activent la PLD1 *via* une interaction directe avec son extrémité C-ter, mais contrairement aux GTPases Rho, le site de régulation précis est encore inconnu (Liang *et al.*, 1997 ; Exton, 2002). L'effet des protéines Arf sur l'activation de la PLD a notamment été montré grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de GEF ou la surexpression de mutants des protéines Arf. La bréféldine A réduit ainsi l'activation de la PLD par de nombreux agonistes, indiquant un effet activateur des protéines Arf régulées par les GEF de haut PM (Dascher et Balch, 1994 ; Rumenapp *et al.*, 1995 ; Shome *et al.*, 1998). Des mutants dominant négatifs ont permis ensuite de montrer le rôle des protéines Arf1 et Arf6 dans l'activation de la PLD (Shome *et al.*, 1998, 2000). Par exemple, notre équipe a montré pour la première fois l'implication d'Arf6 comme activateur de la PLD au cours de l'exocytose régulée, et a pu identifier une mutation ponctuelle au sein d'Arf6 (Arf6(N48I)) qui bloque l'activation de la PLD1 par Arf6 sans affecter l'interaction entre les deux protéines (Galas *et al.*, 1997 ; Vitale *et al.*, 2002).

La stimulation de l'activité PLD par des agonistes coïncide avec une translocation des protéines Arf à la membrane (Houle *et al.*, 1995 ; Hammond *et al.*, 1997). La myristoylation des Arf, qui permet leur association avec la membrane plasmique, augmente ainsi considérablement l'activation de la PLD1 (Cockcroft *et al.*, 1994 ; Brown et Sternweis, 1995). L'activation de la PLD1 par les protéines Arf est également dépendante du PI(4,5)P₂ (Chung *et al.*, 1997 ; Henage *et al.*, 2006). Dans les cellules chromaffines, bien que la PLD1 soit constitutivement retrouvée à la membrane plasmique, elle n'est activée suite à la stimulation que lorsqu' Arf6 est transloquée des granules chromaffines vers la membrane plasmique (Caumont *et al.*, 1998). Ces cellules neurosécrétrices possèdent ainsi un élégant système de contrôle de l'activité PLD pour l'exocytose, avec l'apport de l'activateur Arf6 positionné sur les vésicules dont la fusion doit être promue par la production de PA dépendante de la PLD1 à la membrane plasmique. Dans d'autres systèmes, l'activation de la PLD par Arf est quant à elle dépendante de la translocation membranaire de la GEF ARNO (Chardin *et al.*, 1996). L'activation de la PLD par Arf a en fait été détectée dans de nombreux compartiments cellulaires dont la membrane plasmique, l'appareil de Golgi et le noyau (Ktistakis *et al.*, 1995 ; Provost *et al.*, 1996 ; Whatmore *et al.*, 1996 ; Banno *et al.*, 1997 ; Morgan *et al.*, 1997). La présence d'une PLD Arf-dépendante dans ces différents compartiments suggère son implication dans le trafic vésiculaire au niveau du Golgi, dans la fusion des vésicules et des endosomes, et dans l'assemblage des membranes nucléaires (Moss et Vaughan, 1998). Arf6 assure notamment le trafic entre la membrane plasmique et le système endosomal, *via* l'activation de la PI4P5K et la PLD1 (Melendez *et al.*, 2001 ; Oude Weernink *et al.*, 2007). L'activation de la PLD par Arf6 pourrait par ailleurs être aussi liée de façon indirecte à la stimulation de la production de PI(4,5)P₂ (Martin *et al.*, 1996).

Concernant PLD2, les premières études ont indiqué que les protéines Arf n'avaient aucun effet sur cette isoforme *in vitro* (Colley *et al.*, 1997b ; Jenco *et al.*, 1998). Cependant, d'autres études ont rapporté depuis que la PLD2 était activable par Arf1, mais à un bien moindre degré que la PLD1 (1,5 fois pour la PLD2, contre 50 à 100 fois pour la PLD1) (Lopez *et al.*, 1998 ; Sung *et al.*, 1999a). Bien qu'aucune interaction directe n'ait été détectée entre les protéines Arf et PLD2, des données récentes indiquent que ces GTPases peuvent en effet stimuler la PLD2 sans que le mécanisme en œuvre soit connu (Kim *et al.*, 2003 ; Koch *et al.*, 2003 ; Hiroyama et Exton, 2005 ; Rankovic *et al.*, 2009).

5. Facteurs inhibiteurs

Grâce aux connaissances et aux outils générés par le clonage des différentes PLD, des régulateurs négatifs de PLD1 et PLD2 ont par la suite été identifiés. Ces inhibiteurs comprennent des protéines régulatrices de l'organisation du cytosquelette d'actine et du trafic membranaire, ainsi que des céramides.

a. Inhibiteurs protéiques du cytosquelette

La fodrine, une protéine impliquée dans la structuration du cytosquelette d'actine, fut le premier inhibiteur de la PLD à avoir été caractérisé. Elle inhibe spécifiquement la PLD activée par Arf dans les neutrophiles HL60 perméabilisés, en lien avec une réduction des taux de PI(4,5)P₂ membranaires (Lukowski *et al.*, 1996, 1998). La gelsoline, protéine fixatrice de l'actine-F, inhibe l'activation de la PLD par la bradykinine dans les fibroblastes NIH 3T3 (Banno *et al.*, 1999). Dans le muscle cardiaque, l' α -actinine interagit de façon réversible avec l'extrémité N-ter de la PLD2 et inhibe son activité de manière réversible et dépendante d'Arf1 (Park *et al.*, 2000). Enfin, il a également été montré qu'à travers une interaction directe la β -actine régule négativement la PLD1 et la PLD2, de même que la tubuline pour PLD2 (Lee *et al.*, 2001 ; Chae *et al.*, 2005).

b. Protéines du trafic membranaire

La PIP 5-phosphatase synaptojanine, jouant un rôle dans le recyclage des vésicules synaptiques, inhibe l'activation des PLD en entraînant l'hydrolyse du PI(4,5)P₂, cofacteur essentiel des PLD (Chung *et al.*, 1997). Certaines protéines adaptatrices participant à l'assemblage de la clathrine au niveau des synapses comme AP3 ont également été décrites comme pouvant interagir directement avec la PLD1 et réguler négativement son activité (Lee *et al.*, 1997b ; Cho *et al.*, 2011). Les amphiphysines I et II, hétérodimères s'associant avec le manteau de clathrine, inhibent l'activité des PLD1 et PLD2 induite par le PMA dans les cellules COS-7 (Lee *et al.*, 2000b). La protéine accessoire du complexe SNARE Munc18 est également un régulateur négatif de l'activité PLD *via* une interaction directe (Lee *et al.*, 2004). Pour finir, les synucléines α et β , protéines impliquées dans les pathologies neurodégénératives, inhibent l'activité de la PLD2 *in vitro* (Jenco *et al.*, 1998 ; Payton *et al.*, 2004).

c. Céramides

Des facteurs lipidiques pourraient également inhiber l'activité de la PLD. Ainsi, plusieurs études ont décrit un rôle négatif des céramides sur l'activité PLD stimulée par différents agonistes (Gómez-Muñoz *et al.*, 1995 ; Venable *et al.*, 1996 ; Abousalham *et al.*, 1997 ; Nakashima et Nozawa, 1999). Le groupement céramide représente la partie hydrophobe des sphingolipides, constituée d'un acide gras et d'une molécule de sphingosine. La formation des céramides résulte principalement de l'hydrolyse de la SM ou des cérébrosides, mais également de la production *de novo*. Ils sont impliqués dans la régulation de diverses réponses cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Perry et Hannun, 1998).

L'effet de ces lipides a été démontré en utilisant des céramides capables de traverser la membrane plasmique. La PLD a ainsi été décrite comme une cible des céramides exogènes à chaîne courte dans plusieurs types cellulaires, dont les neutrophiles, les fibroblastes et les cellules RBL-2H3 (Nakamura *et al.*, 1994 ; Jones et Murray, 1995). Dans les cellules HL60, l'ajout de ces

céramides inhibe la PLD1 GTPγS-dépendante associée à la membrane plasmique, alors qu'un analogue biologiquement inactif, le dihydrocéramide, n'a pas d'effet (Venable *et al.*, 1996). En outre, l'utilisation de céramides en support du butanol pour inhiber l'activité PLD a permis de renforcer l'idée d'une action positive de la PLD1 au cours de l'exocytose dans les cellules chromaffines (Vitale *et al.*, 2001). L'addition de céramides entraîne notamment une diminution de l'expression de la PLD1 dans les cellules gliales C6 (Yoshimura *et al.*, 1997). Cependant ces lipides pourraient également agir sur l'activité PLD de façon indirecte, car de nombreux travaux ont montré que les céramides inhibent la translocation membranaire des PKC, ainsi que des petites protéines G Arf et Rho (Venable *et al.*, 1996 ; Abousalham *et al.*, 1997 ; Singh *et al.*, 2001). En système acellulaire, les céramides inhibent également l'activité de la PLD2 recombinante (Singh *et al.*, 2001).

Du fait des limitations inhérentes à l'étude des lipides, le rôle des céramides endogènes sur l'activité PLD reste très peu décrit à ce jour. Il est à noter cependant que des céramides générés sur le feuillet externe de la membrane plasmique sont capables d'empêcher la translocation de la PKC à la membrane (Signorelli *et al.*, 2001). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse *de novo* des céramides entraîne une augmentation de l'activité de la PLD corrélée à une potentialisation de la phagocytose dans les cellules COS-1 (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 2003). De même, un défaut de formation des céramides entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité de la PLD1 dans des cellules musculaires squelettiques L6 (Mebarek *et al.*, 2007).

F. Implications physio-pathologiques des PLD

Au vu de sa localisation ubiquitaire, de ses capacités de remodelage membranaire, et de sa régulation complexe, l'enzyme PLD a été impliquée dans de nombreux processus physiologiques fondamentaux. L'utilisation de mutants catalytiquement inactifs des PLD agissant comme dominants négatifs, d'ARN interférents ou plus récemment d'inhibiteurs isoforme-spécifiques a permis de discriminer les rôles joués par une isoforme particulière. Chez les mammifères, les PLD1 et PLD2 remplissent ainsi des fonctions dans la prolifération et la survie cellulaire, la migration, la réorganisation du cytosquelette, la sécrétion, la phagocytose, le stress oxydatif et l'agrégation plaquettaire (Kam et Exton, 2001 ; McDermott *et al.*, 2004 ; Selvy *et al.*, 2011 ; Jang *et al.*, 2012). Une dérégulation de l'expression ou de l'activité de ces enzymes peut donc avoir des conséquences dramatiques et est ainsi associée à un certain nombre de cancers, de maladies neurodégénératives ou d'infections virales (**figure 27**). La majorité de ces pathologies ne possédant pas de réel traitement curatif à ce jour, l'inhibition sélective des PLD représente alors un enjeu majeur pour le déploiement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Nelson et Frohman, 2015).

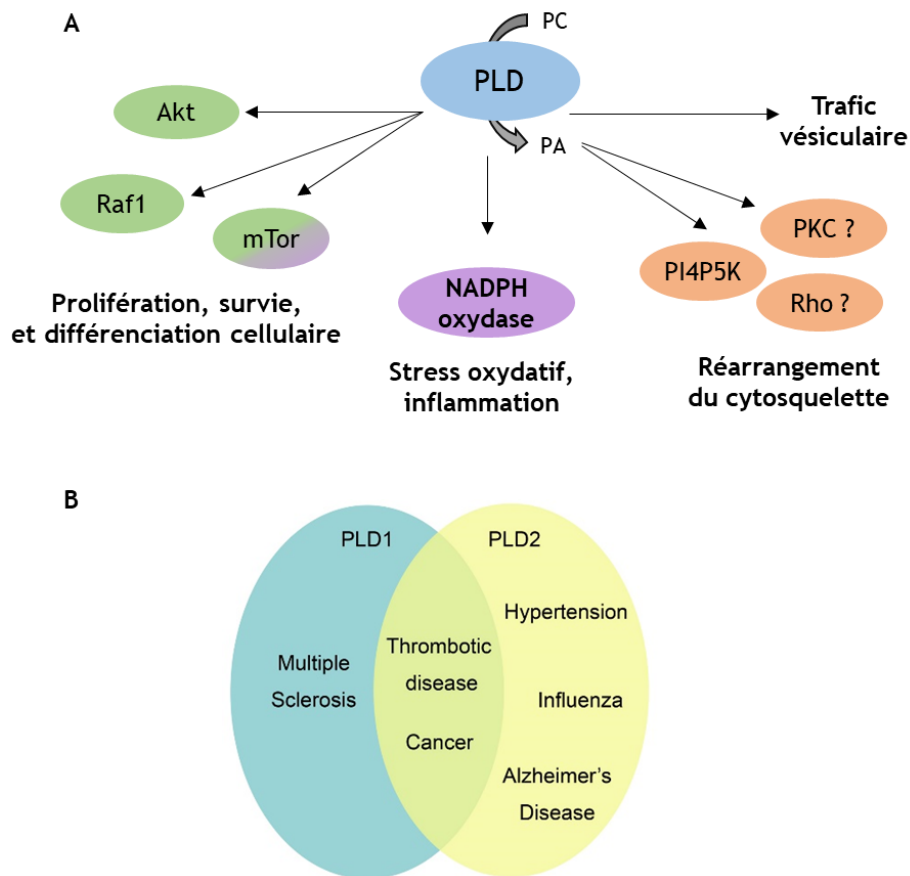


Figure 27 : Rôles des PLD dans la signalisation cellulaire et implications pathologiques

A) Fonctions cellulaires des PLD chez les mammifères

(Adapté de Wang et al., 2006 ; Selvy et al., 2011)

Le PA formé par les PLD1 et PLD2 peut avoir des modes d'action variés et notamment agir sur différentes cibles. Certaines de ces cibles sont connues par exemple dans les processus de survie cellulaire, de défense immunitaire ou encore de réorganisation du cytosquelette. Dans le cas d'autres fonctions régulées par les PLD, comme le trafic vésiculaire, les cibles restent encore majoritairement inconnues.

B) Les PLD1 et PLD2, des cibles thérapeutiques potentielles

(Frohman, 2015)

Plusieurs pathologies ont été mises en lien avec l'activité des PLD1 et PLD2, telles que des maladies auto-immunes, de nombreux types de cancer, des troubles cardio-vasculaires ou encore des maladies neurodégénératives. Les inhibiteurs isoforme-spécifiques des PLD récemment développés ont ainsi de potentielles applications thérapeutiques.

Les effets biologiques des PLD sont majoritairement médiés par la formation de PA, pouvant notamment entraîner des courbures négatives au sein des membranes du fait de sa forme conique, mais également recruter différents effecteurs protéiques. Cependant les PLD peuvent également exercer leurs fonctions par des voies alternatives, incluant la métabolisation du PA en DAG et LPA, et la capacité de réguler certains partenaires *via* une interaction directe PLD-protéine. Très souvent, la régulation d'un processus cellulaire par la PLD peut faire intervenir plusieurs de ces modes d'action, ce qui complexifie la compréhension des mécanismes mis en jeu.

J'ai choisi de décrire ici trois fonctions majeures des PLD : la prolifération cellulaire, le réarrangement du cytosquelette et le trafic membranaire. Je mettrai également l'accent sur les pathologies liées à la PLD qui touchent des systèmes physiologiques en lien avec les axes de recherche de ma thèse, à savoir le système immunitaire ainsi que les systèmes nerveux et endocrine.

1. *Stimulation de la prolifération cellulaire*

La signalisation cellulaire permet de relayer les signaux captés par les récepteurs de la membrane plasmique, entre autres vers le noyau pour activer la transcription de gènes, grâce à l'action de seconds messagers intracellulaires. La mise en évidence du déclenchement d'une activité PLD après stimulation de récepteurs membranaires a permis de démontrer le rôle ces enzymes dans la transduction du signal. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication de la PLD dans le contrôle de processus biologiques tels que la migration, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire (Boarder, 1994 ; Janmey et Lindberg, 2004 ; McDermott *et al.*, 2004). Le PA a notamment été identifié comme un activateur d'un certain nombre de kinases de signalisation, y compris mTOR (*mammalian target of rapamycin*), Raf1, la sphingosine kinase SPHK1 et la PI4P5K (Rizzo *et al.*, 1999 ; Delon *et al.*, 2004).

Dans de nombreux modèles cellulaires, l'inhibition de l'activité PLD par des alcools primaires provoque l'arrêt de la prolifération cellulaire (Kötter *et al.*, 2000). Il est à noter que l'activation de la PLD est très souvent parallèle à celle de la PLC, provoquant la stimulation de la PKC et la mobilisation du calcium intracellulaire, activateurs de la PLD et de la prolifération (Boarder, 1994). Les signaux de survie et de prolifération tels que des hormones ou facteurs de croissance activent la synthèse de PA en stimulant l'activité de la PLD, par le biais de leur fixation à des RTK comme l'EGFR ou bien à des RCPG (Zhang et Akhtar, 1998). Les deux voies de signalisation les plus décrites dans ces processus sont celles impliquant la régulation de mTOR (voie PLD-PA-Rheb-mTOR) ou des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases (voie PLD-PA-MAPK).

a. *Régulation de la voie mTOR*

Plusieurs études ont mis en évidence que le rôle anti-apoptotique de la PLD s'exerce essentiellement *via* la régulation de l'activité de l'enzyme mTOR, appartenant à la famille des sérine/thréonine kinases (Hay et Sonenberg, 2004 ; Manning et Cantley, 2007 ; Foster, 2009). La kinase mTOR est un acteur très connu des voies de survie et de prolifération cellulaire, régulant la synthèse protéique en phosphorylant notamment son effecteur S6K (*ribosomal S6 kinase*). Un niveau anormalement élevé d'activité mTOR semble ainsi être une cause majeure dans le développement de nombreux types de cancers (Kasai *et al.*, 1998 ; Martelli *et al.*, 1999). Dans les cellules, mTOR se présente sous la forme d'une sous-unité catalytique pouvant former deux complexes différents, mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1, contenant le composé Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*), est la cible fonctionnelle de la rapamycine. Ce produit

bactérien naturel peut inhiber mTORC1 en s'associant à son récepteur intracellulaire, FKBP12. Le complexe FKBP12-rapamycine se fixe directement sur le domaine FRB (*FKBP12-rapamycin binding*) de mTORC1 et bloque ses fonctions. Le complexe mTORC2 en revanche contient Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) et n'est inactivé qu'à la suite d'un traitement prolongé avec la rapamycine.

Le PA semble être indispensable à la stabilité des deux complexes puisque la sous-unité mTOR ne se lie pas à ses partenaires en l'absence de PA (Foster, 2010). Plusieurs études ont démontré que l'activité de la PLD1 régule la voie mTOR/S6K *via* la production de PA (Fang *et al.*, 2001 ; Kam et Exton, 2004 ; Yoon *et al.*, 2011). Le PA interagit directement avec mTORC1 au niveau de son domaine FRB, régulant ainsi l'activation de mTORC1 de manière compétitive avec la rapamycine (Fang *et al.*, 2001 ; Chen et Fang, 2002 ; Toschi *et al.*, 2009 ; Menon *et al.*, 2017). Dans les cellules HEK 293 stimulées, le PA produit par la PLD1 est capable d'activer mTORC1 et S6K1 par l'intermédiaire de Cdc42 (Fang *et al.*, 2003). La PLD1 pourrait aussi réguler l'activation de mTOR *via* l'interaction avec la GTPase Rheb, un effecteur de mTOR (Sun *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'addition d'acide oléique aux cellules Calu-1 induit la production de PA *de novo*, qui active les complexes mTORC1 et mTORC2, suggérant que mTOR pourrait aussi avoir un rôle de senseur de lipides (Menon *et al.*, 2017).

b. Régulation de la voie des MAPK

Le PA généré par la PLD est également capable de recruter la sérine/thréonine kinase Raf1, qui est impliquée dans l'activation de la cascade des MAP kinases (MAPK) lors d'une activation mitogénique (Andresen *et al.*, 2002 ; Foster et Xu, 2003). La voie des MAPK est une voie de prolifération cellulaire fortement impliquée dans les phénomènes de tumorigenèse, qui nécessite initialement la translocation de Raf1 à la membrane plasmique et son activation successive par la GTPase Ras (Mineo *et al.*, 1997 ; Ghosh *et al.*, 2003). Il a été montré que Raf1 pouvait interagir directement avec plusieurs lipides membranaires et en particulier avec le PA, au niveau d'un site distinct de celui de la PS antérieurement caractérisé (Ghosh *et al.*, 1996). L'ajout de butanol prévient le recrutement membranaire de Raf1 induit par le PMA dans les cellules MDCK, suggérant la nécessité d'une activité PLD. Ce résultat a par la suite été confirmé par un autre groupe, qui a décrit que l'insuline stimule la production de PA par la PLD2 de manière Arf-dépendante et que la translocation membranaire de Raf1 était dépendante de cette activité. Ces auteurs ont notamment montré qu'après une association transitoire de Raf1 et Ras à la membrane plasmique, ces protéines sont internalisées conjointement avec le récepteur de l'insuline dans le compartiment endosomal. La régulation de la cascade se produirait ainsi au niveau d'endosomes riches en cholestérol et PA, et contenant les MAPK (Rizzo *et al.*, 1999, 2000). L'implication de la PLD1 dans cette voie a également été rapportée (Wang *et al.*, 2002 ; Ghosh *et al.*, 2003). Ces données suggèrent donc bien un rôle crucial des PLD dans le recrutement PA-dépendant de Raf1

et la régulation subséquente de la cascade des MAPK. Il est aussi intéressant de souligner que l'activation de la voie MAPK pourrait être un moyen de régulation de l'expression de la PLD1 par le PA. En effet, le traitement des cellules cancéreuses SKBR3 avec un facteur de croissance induit une augmentation de l'expression de PLD1 *via* un mécanisme dépendant de l'activation des voies MAPK, notamment la voie Ras-Raf-Mek-ERK1/2-NFκB, activée par la production de PA (Kang et Min, 2010).

c. Activité PLD et cancers

L'activité PLD apparaît comme un régulateur critique de la survie et de la prolifération cellulaire. Par conséquent, un défaut d'expression, de localisation ou d'activité des isoformes PLD1 et PLD2 a été fréquemment associé avec la formation et l'invasion de tumeurs cancéreuses chez l'humain (Gomez-Cambronero, 2014). Un niveau d'activité PLD anormalement élevé, corrélé à l'augmentation de l'expression d'au moins une des isoformes, a ainsi été observé dans les cellules tumorales provenant de cancer du sein (Uchida *et al.*, 1997), de l'ovaire (Iorio *et al.*, 2010), du rein (Zhao *et al.*, 2000), du côlon (Saito *et al.*, 2007), de la prostate (Utter *et al.*, 2018), ainsi que de glioblastomes (Bruntz *et al.*, 2014b). L'augmentation du niveau de PA cellulaire qui en résulte pourrait expliquer une partie des résistances à la rapamycine observées dans certains cancers (Foster, 2010 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

Les PLD semblent impliquées dans les différentes étapes de la progression cancéreuse. La tumorigenèse entraînée par la surexpression *in vivo* de l'oncogène H-Ras dans des fibroblastes est bloquée par la coexpression d'une forme inactive de la PLD1 et peut être restaurée par l'ajout de PA (Buchanan *et al.*, 2005). Une activité élevée de la PLD semble également essentielle pour la survie des cellules cancéreuses puisque l'utilisation de butanol ou de l'honokiol, un composé naturel aux propriétés anticancéreuses, inhibe l'activité PLD tout en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses (Zhong *et al.*, 2003 ; Garcia *et al.*, 2008). De plus, il existe une corrélation entre le niveau d'expression de PLD2 et la taille des tumeurs colorectales chez des patients, suggérant un lien entre l'activité PLD et la prolifération des cellules tumorales (Saito *et al.*, 2007). Un lien a également été démontré entre la surexpression des PLD et la sécrétion de la métalloprotéinase MMP-2, impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire et la formation de métastases (Park *et al.*, 2009). Enfin, l'activité des PLD1 et PLD2 joue également un rôle dans l'environnement tumoral, en favorisant l'angiogenèse des tumeurs (Chen *et al.*, 2012 ; Ghim *et al.*, 2014). Un nombre croissant de données indiquent ainsi que la PLD pourrait être une bonne cible thérapeutique dans un grand nombre de cancers humains, à différents stades de la progression tumorale (Su *et al.*, 2009). L'utilisation des inhibiteurs des PLD tels que le FIPI ou des inhibiteurs isoforme-spécifiques a montré des résultats prometteurs sur plusieurs types de cancers. De plus, leur faible toxicité *in vivo* permet d'envisager une utilisation clinique (Brown *et al.*, 2017).

2. Réarrangement du cytosquelette

L'observation d'une association des PLD1 et PLD2 avec certains éléments du cytosquelette d'actine a suggéré une implication de ces enzymes dans la dynamique de celui-ci. De nombreuses études ont également pu établir un lien entre le PA et la polymérisation de l'actine dans différents types cellulaires, comme les fibroblastes, les monocytes et les neutrophiles (Ha et Exton, 1993 ; Zhou *et al.*, 1995 ; Siddiqui et English, 1997). En outre, dans ces différentes études, les effets observés apparaissent spécifiques du PA par rapport au LPA ou au DAG.

Les PLD de mammifères jouent en effet un rôle dans le remaniement du cytosquelette induit par différents agonistes, en participant principalement à la formation de fibres de stress (Rudge et Wakelam, 2009). Une première étude a décrit que la stimulation des fibroblastes IIC9 par l' α -thrombine provoque un allongement des cellules accompagné par l'apparition de fibres de stress, et que ces effets sont reproduits par l'ajout de PA exogène ou d'une PLD bactérienne (Ha et Exton, 1993). Il a ensuite été montré que suite à la stimulation par le LPA, la polymérisation de l'actine est dépendante d'une PLD activée par RhoA en aval de la liaison du LPA à son récepteur membranaire (Ha *et al.*, 1994 ; Cross *et al.*, 1996). L'activation de la PLD a également été mise en relation avec la formation d'autres structures d'actine. Par exemple, l'apparition de filopodes a été observée dans des cellules fibroblastiques surexprimant la PLD2 (Colley *et al.*, 1997b). Dans les mastocytes, la PLD2-GFP est localisée au niveau des *ruffles* riches en actine après la stimulation des cellules par l'antigène. La PLD2 semble impliquée dans le réarrangement de l'actine corticale menant à la formation de ces protrusions membranaires (O'Luanaigh *et al.*, 2002). Dans les basophiles RBL-2H3, la PLD1b-HA est recrutée à la membrane plasmique après stimulation antigénique, où elle colocalise avec ses activateurs Rac1, Arf6, et PKC α dans les lamellipodes et les *ruffles* (Powner *et al.*, 2002).

Les phénomènes de réorganisation de l'actine sont ainsi contrôlés *via* l'activation directe de la PLD par les PKC et les petites protéines G, qui ont eux-mêmes été décrits comme des acteurs essentiels du réarrangement du cytosquelette (Rudge et Wakelam, 2009). Il est bien établi par exemple que les protéines G de la famille Rho sont responsables de la formation des fibres de stress après activation des fibroblastes 3T3 (Ridley, 1999). L'activation directe de la PLD1 par la GTPase RhoA favorise la fasciculation des filaments d'actine par l' α -actinine (Kam et Exton, 2001). En accord avec ces résultats, la présence de la PLD au niveau du cytosquelette est associée à une cotranslocation des GTPases Arf et RhoA (Hodgkin *et al.*, 1999 ; Iyer et Kusner, 1999). Cependant, la régulation du réarrangement de l'actine par les activateurs de la PLD apparaît plus complexe. En effet, le PA produit par la PLD à la membrane plasmique recrute lui-même certains régulateurs positifs de la PLD, comme Rac1, DOCK1 ou DOCK2, et ces interactions jouent un rôle important dans la formation des *ruffles* et des lamellipodes durant la migration cellulaire (Chae *et al.*, 2008 ; Nishikimi *et al.*, 2009). La production de PA par la PLD régule également la localisation

membranaire et l'activité de la PKC ϵ (Jose Lopez-Andreo *et al.*, 2003). Par ailleurs, les sérine/thréonine kinases de la famille PAK (*p21 activated kinases*) sont aussi connues pour être activées par le PA. Ces enzymes régulent la formation des neurites *via* la réorganisation du cytosquelette d'actine suite à leur translocation membranaire (Bokoch *et al.*, 1998 ; Daniels *et al.*, 1998 ; Hayashi *et al.*, 2007), alors que les neurites présentent une synthèse importante de PA au cours de leur développement (Ammar *et al.*, 2013).

L'effet de la PLD sur le réarrangement de l'actine peut également être médié indirectement par la stimulation de l'activité des PI4P5K par le PA, et ainsi la formation de PI(4,5)P₂ (Honda *et al.*, 1999). En effet, ce phosphoinositide est un régulateur majeur de la dynamique du cytosquelette, connu pour interagir avec au moins 30 protéines associées à l'actine, dont la profiline, la gelsoline et l' α -actinine, et réguler de ce fait la formation des *ruffles* ou des fibres de stress (Janmey *et al.*, 1999). L'injection d'anticorps ciblant le PI(4,5)P₂ dans des fibroblastes stimulés au LPA inhibe ainsi la formation des fibres de stress et des adhésions focales formées *via* l'activation de Rho (Gilmore et Burridge, 1996). Les 3 isoformes de PI4P5K présentes chez les mammifères (α , β , et γ) ont été impliquées dans le contrôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine (van den Bout et Divecha, 2009 ; Roach *et al.*, 2012). En outre, la surexpression des isoformes α et β induit la formation de fibres d'actine de manière Rho dépendante (Shibasaki *et al.*, 1997 ; Yamamoto *et al.*, 2001), alors que la surexpression de la synaptojanine, une phosphatase du PI(4,5)P₂, réduit le nombre de fibres de stress dans les cellules COS-7 (Sakisaka *et al.*, 1997). Un rôle de la PLD2 dans l'activation de la PI4P5K impliquée dans la formation des *ruffles* a été mis en évidence dans des cellules HeLa stimulées par l'EGF (Honda *et al.*, 1999). Les PI4P5K sont toutes stimulées par le PA, l'isoforme γ à un niveau bien plus élevé que les deux autres (Ishihara *et al.*, 1998). Cette interaction semble réguler la formation des fibres de stress dans les cellules NIHT3 (Jarquin-Pardo *et al.*, 2007).

3. Trafic membranaire

De par sa forme conique favorisant les courbures membranaires, il est facile d'entrevoir un rôle du PA dans les phénomènes de bourgeonnement ou de fusion membranaire. De plus, la caractérisation des protéines Arf, PKC et RhoA en tant que régulateurs des PLD a permis de suggérer une implication de ces enzymes, et notamment de PLD1, dans le trafic vésiculaire (Kooijman *et al.*, 2005). La recherche des fonctions des PLD dans différents types cellulaires a confirmé par la suite que l'activité de ces enzymes est impliquée dans plusieurs processus de trafic vésiculaire incluant la sécrétion et l'endocytose (Jones *et al.*, 1999). Par ailleurs, une étude en collaboration avec notre équipe a également montré l'implication spécifique de la PLD2 dans la formation des exosomes au sein des corps multivésiculaires (Ghossoub *et al.*, 2014).

a. Formation de vésicules à partir de l'appareil de Golgi

De nombreuses études ont montré l'implication des GTPases de la famille Arf dans diverses voies de transport vésiculaire (D'Souza-Schorey et Chavrier, 2006). L'identification d'Arf comme un activateur de la PLD en 1993 a alors rapidement donné lieu à des suppositions sur le rôle que pourrait jouer cette enzyme dans le trafic, et notamment dans le recrutement des coatomères constituant le manteau des vésicules de transport (Brown *et al.*, 1993 ; Kahn *et al.*, 1993 ; Cockcroft, 1996 ; Roth *et al.*, 1999). Dans des cellules de mammifères, les deux isoformes de la PLD semblent être détectées à la périphérie du Golgi et sur des vésicules péri-golgiennes (Freyberg *et al.*, 2001, 2002). La PLD1 surexprimée a été retrouvée sur les granules de sécrétion dans les cellules HL60 (Brown *et al.*, 1998), ainsi que dans les membranes de l'appareil de Golgi (Colley *et al.*, 1997b). De plus, une forte activité PLD stimulée par Arf a été mesurée dans les membranes du Golgi des cellules CHO (Ktistakis *et al.*, 1995). Ces données ont d'autant plus supporté un rôle potentiel de l'activité PLD Arf-dépendante dans la formation ou le transport de vésicules coatées au niveau de l'appareil de Golgi.

En premier lieu, la PLD a été impliquée dans le transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le RE. Il a été montré initialement que la protéine Arf1 régule la formation des vésicules à partir du CGN en contrôlant l'assemblage du coatomère COPI (Donaldson *et al.*, 1990 ; Robinson et Kreis, 1992). Or, un traitement à l'éthanol empêche le recrutement des protéines COPI et le bourgeonnement de vésicules coatées au niveau du CGN. Ces effets semblent spécifiques de l'inhibition de l'activité PLD puisqu'ils sont rétablis par l'apport de PA exogène. Par ailleurs, des vésicules artificielles contenant du PA lient mieux les protéines du manteau COPI que celles qui n'en contiennent pas, reflétant un rôle du PA dans le recrutement de ces protéines (Ktistakis *et al.*, 1996). De manière intéressante, l'ajout de PLD bactérienne aux membranes de l'appareil de Golgi induit la formation de vésicules COPI en l'absence d'Arf, ce qui suggère un rôle direct de la PLD, indépendant d'Arf. Le double rôle d'Arf dans l'activation de la PLD et l'interaction avec les coatomères a ensuite été confirmé (Stamnes *et al.*, 1998). Des études plus récentes ont montré que la PLD2 est impliquée dans la fission et la formation des vésicules COPI *via* la formation du PA (Yang *et al.*, 2008).

Ces diverses observations indiquent bien que l'activation de la PLD est un mécanisme important dans le recrutement des protéines du manteau et la formation des vésicules coatées au niveau de l'appareil de Golgi. Par ailleurs, nous pouvons également mentionner que le transport du RE vers le CGN est inhibé par l'éthanol dans les cellules CHO, suggérant un rôle de l'activité PLD également au niveau du trafic antérograde (Bi *et al.*, 1997). Enfin, la PLD semble également jouer un rôle important dans le bourgeonnement des vésicules d'exocytose. Ainsi, la surexpression de PLD1 humaine dans des cellules pituitaires entraîne la formation de vésicules à partir du TGN, alors qu'un mutant inactif de la PLD ou l'ajout d'un alcool primaire empêchent cet événement. La

formation des vésicules de sécrétion dépend ici de l'activation de la PLD par Arf1 (Chen *et al.*, 1997). D'autres résultats ont montré par la suite que l'accumulation spécifique de PA par rapport au DAG dans la membrane du TGN était un facteur clé dans le bourgeonnement des vésicules de sécrétion (Siddhanta et Shields, 1998).

b. Endocytose et maladies infectieuses

La nécessité d'une déformation membranaire pour la formation des endosomes et l'enrichissement en PA au niveau des membranes endosomales laissent suggérer la synthèse de PA durant l'endocytose. L'étude des fonctions des PLD1 et PLD2 a ainsi démontré leur implication dans les processus d'endocytose, incluant l'internalisation de récepteurs après leur activation (Roth, 2008). Le rôle des PLD peut dépendre en partie de leur interaction avec la dynamine, qui est impliquée dans l'étape de scission des endosomes. Plus précisément, le domaine PX des PLD est capable de stimuler l'activité GTPase de cette protéine, suggérant que ces enzymes puissent agir en tant que GAP à ce niveau (Lee *et al.*, 2006). De manière intéressante, la surexpression des formes catalytiquement inactives des PLD1 ou PLD2 retarde l'endocytose de l'EGFR, à l'inverse des formes sauvages qui l'accélèrent. Ces données indiquent donc également un rôle facilitateur de l'activité des PLD dans l'internalisation du récepteur (Shen *et al.*, 2001). L'inhibition sélective de la PLD2 bloque l'endocytose clathrine-dépendante du récepteur à la transferrine (Oguin *et al.*, 2014). La génération de PA par la PLD2 joue également un rôle dans l'endocytose clathrine-indépendante, puisqu'elle semble faciliter la formation de cavéoles (Jiang *et al.*, 2016). La PLD1 et la PLD2 ont d'ailleurs été retrouvées au niveau de microdomaines riches en cavéoline dans divers types cellulaires (Czarny *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2000 ; Diaz *et al.*, 2002 ; Han *et al.*, 2002).

Par ailleurs, au cours de la phagocytose, un intense remodelage membranaire s'effectue afin de former des extensions membranaires nécessaires à l'internalisation d'agents pathogènes par exemple. Notre équipe ainsi que d'autres groupes ont ainsi montré l'importance de l'activité des PLD1 et PLD2 au niveau de la membrane plasmique pour la formation des phagosomes (Kusner *et al.*, 1999 ; Corrotte *et al.*, 2006). La fonction de ces isoformes dans la phagocytose sera développée dans un prochain chapitre dédié à ce processus. Des données récentes indiquent également que la PLD4 régule la phagocytose dans les cellules microgliales, bien qu'aucune activité PLD n'ait été décrite à ce jour pour cette isoforme. Suite à l'activation des cellules microgliales, l'expression de la PLD4 augmente, tandis que l'extinction temporaire de son expression par ARN interférence réduit la capacité phagocytaire des cellules (Otani *et al.*, 2011).

Certains agents pathogènes parasites profitent des voies d'endocytose afin d'infecter les cellules de l'organisme. L'inhibition des PLD pourrait alors avoir des effets prophylactiques sur la contamination, en bloquant notamment leur entrée dans les cellules (Brown *et al.*, 2017). De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les PLD sont par exemple envisagées pour contrer le virus de la grippe (*Influenza*), qui pose des difficultés sanitaires du fait de son rythme de mutation

très élevé. En effet, la PLD2 a été identifiée au cours d'un criblage comme un candidat potentiel car elle favorise l'endocytose rapide du virus *Influenza* (Karlas *et al.*, 2010). Le prétraitement des cellules de l'épithélium respiratoire avec un inhibiteur sélectif de cette isoforme ralentit l'entrée de diverses souches virales dont la souche H1N1 et réduit drastiquement leur taux de réplication, permettant d'augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire (Oguin *et al.*, 2014 ; O'Reilly *et al.*, 2014).

c. Exocytose et défaut de communication hormonale ou nerveuse

Le PA est supposé être un lipide fusogénique, puisqu'il possède des propriétés physiques qui en théorie favorisent la fusion des membranes lipidiques (Kooijman *et al.*, 2005). Un certain nombre de recherches ont alors été menées afin de déterminer si l'activité des enzymes de production du PA pouvait réguler des processus physiologiques qui nécessitent ce phénomène de fusion membranaire. La formation du PA par la DGK a par exemple été impliquée dans la libération des enzymes acrosomiales des spermatozoïdes (Lopez *et al.*, 2012 ; Pelletán *et al.*, 2015) ou encore dans la sécrétion des micronèmes, des organites spécialisés retrouvés chez les parasites comme *Toxoplasma gondii* (Bullen *et al.*, 2016). Par ailleurs, dans la majorité des cellules sécrétrices des mammifères, l'activité de la PLD a été identifiée comme ayant un rôle primordial dans l'exocytose régulée (Tanguy *et al.*, 2018c). Les mécanismes d'action du PA au cours de l'exocytose régulée restent toutefois très peu connus à l'heure actuelle.

Initialement, il a été montré que l'addition de PA exogène ou la génération de ce lipide par une PLD d'origine bactérienne stimule la sécrétion d'aldostérone par les cellules glomérulaires surrénales (Bollag *et al.*, 1990), ainsi que la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques des îlots de Langerhans (Metz et Dunlop, 1990). La stimulation des neutrophiles HL60 avec le fMLP augmente l'activité PLD en parallèle de la sécrétion, soutenant un rôle de l'activité PLD endogène dans l'activité sécrétrice (Xie *et al.*, 1991 ; Stutchfield et Cockcroft, 1993). Plusieurs études ont ensuite rapporté une réduction drastique de la sécrétion régulée suite à un traitement au 1-butanol sur de nombreux types cellulaires (Benistant et Rubin, 1990 ; Xie *et al.*, 1991 ; Caumont *et al.*, 1998 ; Choi *et al.*, 2002 ; Disse *et al.*, 2009). Ces données ont permis de suggérer l'importance du PA formé par la PLD dans l'exocytose, bien que les conclusions restent questionnables étant donné les potentiels effets aspécifiques des alcools primaires. La PLD1 et la PLD2 ont parfois été retrouvées impliquées toutes les deux dans l'exocytose, par exemple au cours de la dégranulation des mastocytes. Dans ce cas, il est probable qu'elles agissent à des étapes distinctes, comme le suggère la différence de localisation entre les deux isoformes (Choi *et al.*, 2002). Cependant, la surexpression de mutants catalytiquement inactifs combinée avec l'utilisation d'ARN interférents a permis de distinguer un rôle plus spécifiquement de la PLD1 au cours de l'exocytose régulée. L'implication distinctive de la PLD1 dans le processus d'exocytose a été notamment démontrée au niveau des cellules β pancréatiques et des neurones (Humeau *et al.*,

2001 ; Hughes *et al.*, 2004 ; Waselle *et al.*, 2005). De nombreuses données sous-tendent également un rôle majeur de la PLD1 dans l'exocytose régulée des cellules neuroendocrines (Vitale, 2010 ; Tanguy *et al.*, 2016), et celles-ci seront détaillées dans le deuxième chapitre de la partie présentant les résultats obtenus au cours de ma thèse.

Du fait de la forte prévalence du diabète et de la chronicité de cette pathologie, la régulation de la sécrétion de l'insuline a fait l'objet de très nombreuses études. L'une d'entre elles a montré que la stimulation des cellules β pancréatiques MIN6 avec le glucose induit une augmentation de l'activité PLD en parallèle de la libération d'insuline. Dans ces cellules, seule l'isoforme PLD1 est exprimée et pas l'isoforme PLD2. La PLD1 endogène est détectée en partie sur des vésicules riches en insuline, et cette localisation est préservée lorsque la protéine sauvage est surexprimée. Le traitement avec le 1-butanol ou la surexpression du mutant catalytiquement inactif PLD1(K898R) inhibent fortement la libération d'insuline (Hughes *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que le PA formé sur les granules puisse agir dans la fusion membranaire. Cependant, il semblerait que l'activation de la PLD1 par Arf6 en réponse au glucose dans ces cellules ait également un effet sur la transcription du gène de l'insuline, *via* l'activation de la voie mTOR-S6K (Ma *et al.*, 2010). De façon intéressante, la PLD1 joue également un rôle sur l'exocytose dans les cellules ciblées par l'insuline, mais d'une façon plus originale. Suite à une stimulation par l'insuline, des vésicules contenant le transporteur du glucose Glut4 sont insérées à la membrane plasmique des adipocytes afin d'internaliser le glucose extracellulaire. Dans les adipocytes 3T3-L1, la PLD1 a été observée associée à ces vésicules contenant Glut4. La surexpression de la PLD1 augmente la localisation de Glut4 à la membrane plasmique, et cet effet est bloqué par l'expression du mutant inactif de PLD1(K898R) ou par l'extinction de la PLD1. Le traitement des cellules avec de la LPC, qui s'insère et s'accumule au niveau du feuillet externe en y induisant potentiellement des courbures membranaires positives, restaure la translocation de Glut4 après stimulation lorsque la PLD1 a été inactivée. Ceci suggère donc que dans ce modèle la PLD1 soit impliquée dans l'étape finale de la fusion membranaire (Huang *et al.*, 2005).

Au vu du rôle fondamental du système nerveux dans la communication cellulaire, un très grand nombre de recherches portent sur les mécanismes qui sous-tendent le développement neuronal et la neurotransmission. Le rôle essentiel des lipides dans les fonctions nerveuses a été particulièrement documenté. De nombreuses données indiquent ainsi que le PA est un acteur clé, dont le défaut de formation a été associé à plusieurs pathologies neuronales (Tanguy *et al.*, 2019, voir en annexe). De plus, l'isoforme PLD1 a été localisée de façon ubiquitaire dans les neurones du système nerveux central et les oligodendrocytes, et la PLD2 a été observée dans les astrocytes (Zhang *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2010).

D'une part, plusieurs études ont suggéré l'implication de la PLD1 et de la PLD2 dans la croissance neuritique, événement crucial du développement du système nerveux (Kanaho *et al.*,

2009 ; Ammar *et al.*, 2013, 2014). L'expression de la PLD1 en particulier est très élevée au cours des premiers jours de développement des neurones corticaux et hippocampiques en culture (Yoon *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2012). Notre équipe a d'ailleurs pu observer une augmentation de la formation du PA en lien avec l'activation de la PLD1 dans les neurites en croissance, ainsi qu'un retard significatif de développement des neurones issus de souris *Pld1*^{-/-} (Ammar *et al.*, 2013). De manière intéressante, des observations similaires ont été faites dans le modèle murin *Rsk2*^{-/-}, utilisé pour étudier les mécanismes pathologiques responsables du CLS. RSK2 est une kinase de la famille des s6 kinases ribosomales dont la mutation ou l'absence d'expression conduit chez l'homme à des retards de croissance et à un retard mental important. Durant la maturation des neurones, des vésicules contenant PLD1 ainsi que la protéine SNARE VAMP7 fusionnent avec la membrane plasmique au niveau du cône de croissance de l'axone. Cette fusion est fortement altérée par l'utilisation d'inhibiteurs de PLD1 ou de RSK2, suggérant que la phosphorylation de la PLD1 par RSK2 est nécessaire à l'approvisionnement en membrane aux cônes de croissance dans les neurones en développement (Ammar *et al.*, 2013). De plus, l'activité de la PLD1 est stimulée par RSK2 dans des cellules neuroendocrines, et cette régulation intervient dans la sécrétion régulée (Zeniou-Meyer *et al.*, 2008). Un défaut d'activation de la PLD1 dans le système nerveux pourrait ainsi expliquer en partie la déficience intellectuelle rencontrée chez les patients souffrant du CLS. Un retard de développement semblable est rencontré chez les nouveau-nés présentant un syndrome d'alcoolisation fœtale (Ehrhart *et al.*, 2019). L'éthanol étant capable d'empêcher la formation de PA par la PLD, il est tout à fait probable que l'atteinte neurologique suite à l'exposition du fœtus à l'éthanol soit due entre autres à l'inhibition des PLD neuronales.

D'autre part, un rôle du PA produit par la PLD1 dans la transmission synaptique a pu être proposé. Par exemple, dans des neurones d'aplysie, l'injection de PLD1 catalytiquement inactive entraîne une inhibition de la libération d'acétylcholine, montrant un lien entre la PLD1 et la sécrétion régulée au niveau des synapses. Cet effet global n'est apparemment pas lié à un défaut de recrutement des vésicules synaptiques mais à une réduction du nombre de sites d'exocytose fonctionnels, indiquant que la PLD1 favoriserait plutôt la fusion membranaire durant la neurotransmission (Humeau *et al.*, 2001). Par ailleurs, la production du PA par la DGK θ est nécessaire au recyclage efficace des vésicules synaptiques dans les synapses excitatrices (Goldschmidt *et al.*, 2016). Pour terminer, le rôle de la PLD dans la sécrétion régulée pourrait expliquer son implication dans les phénomènes de neurodégénérescence (Oliveira et Di Paolo, 2010). En effet, une activité PLD aberrante a été détectée en *post-mortem* dans le cerveau de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Klein, 2005). Or, la PLD1 joue un rôle important dans l'exocytose de la protéine APP (*amyloid precursor protein*), un précurseur du peptide amyloïde β dont l'agrégation extracellulaire est un marqueur de la maladie d'Alzheimer (Cai *et al.*, 2006a). La PLD1 interagit également avec la préséniline-1, un composant du complexe γ -secrétase responsable du clivage de l'APP, et semble également réguler le trafic de cette protéine (Cai *et al.*,

2006b ; Liu *et al.*, 2009). De manière intéressante, la déplétion de la PLD2 présente la capacité de restaurer le déclin cognitif et l'altération de la transmission synaptique observés dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Oliveira et Di Paolo, 2010).

En conclusion, bien que l'implication des PLD1 et PLD2 dans les processus d'endocytose et d'exocytose n'est plus à prouver, les mécanismes mis en jeu sont encore extrêmement méconnus. Au vu notamment de l'implication clinique des PLD, il apparaît crucial de préciser la dynamique de formation du PA au cours de ces processus, ainsi que ses modes d'action et ses cibles potentielles. Le développement d'outils de détection du PA, relativement rares à l'heure actuelle, permettra ainsi une meilleure compréhension des rôles du PA dans le trafic membranaire.

Résultats et discussion

Objectifs de la thèse

À mon arrivée au laboratoire, une multitude d'indices suggérait que l'activation des PLD conduisait à la production de PA au niveau des sites d'exocytose dans les cellules neuroendocrines et au niveau des phagosomes naissants dans les macrophages. Diverses données indiquent que le PA joue probablement un rôle de facilitateur pour l'exocytose et la phagocytose. Toutefois, les résultats obtenus à ce stade ne permettaient pas d'avoir une vision dynamique de la synthèse du PA, ni de comprendre les étapes exactes dans lesquelles il intervient, et enfin la question de l'implication des différentes formes de PA était totalement inexplorée. Mes travaux de thèse ont visé à répondre à ces questions et peuvent se diviser en trois thèmes majeurs :

1) Sondes moléculaires et dynamique du PA

J'ai entrepris de poursuivre la caractérisation de différents domaines polypeptidiques de liaison au PA déjà débutée avant mon arrivée au laboratoire, afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction protéine-PA, mais aussi de générer des sondes moléculaires permettant de visualiser de manière dynamique les niveaux de PA dans des sous-domaines membranaires au sein même des cellules. Les outils que j'ai contribué à développer et caractériser m'ont ensuite servi à étudier la dynamique du PA dans les macrophages et les cellules chromaffines.

2) Régulation de la synthèse du PA au cours de la phagocytose

La synthèse de PA par la PLD au cours de la phagocytose est notamment régulée par les GTPases Ral. Cependant, l'implication d'autres régulateurs est également probable, au premier rang desquels on peut citer la GTPase Arf6 qui a été impliquée précédemment dans la phagocytose. Des données précédentes ayant montré que la GTPase Arf6 stimule l'activité PLD dans les cellules chromaffines au cours de l'exocytose, de concert avec la GTPase RalA, j'ai entrepris de tester la possibilité d'une contribution d'Arf6 dans la synthèse de PA au niveau des phagosomes naissants par une approche d'ARN interférence.

3) Fonction de différentes formes de PA dans l'exocytose régulée

Le PA se décline en pas moins d'une quarantaine de formes différentes en fonction des acides gras qui le constituent. Sur la base de mesures de l'activité de sécrétion des cellules chromaffines réalisées avant mon arrivée dans l'équipe, nous avons mis en lumière la participation du PA dans deux étapes distinctes de l'exocytose : la définition du nombre de sites fonctionnels, mais aussi la vitesse d'ouverture du pore de fusion. Par la suite, j'ai étudié la participation de différentes espèces de PA dans ces étapes par des expériences de reconstitution. J'ai décidé d'approfondir ces résultats en étudiant notamment la participation du PA dans le transport des granules de sécrétion vers les sites d'exocytose, ainsi que la recapture de la membrane granulaire après fusion. Pour finir, j'ai utilisé les sondes moléculaires du PA pour préciser à l'échelle ultrastructurale la localisation du PA par rapport aux sites d'exocytose.

CHAPITRE I : Formation du PA et régulation des PLD au cours de la phagocytose

- Introduction -

I. Le processus de phagocytose

La phagocytose se définit comme l'ingestion et la digestion cellulaire de particules d'un diamètre supérieur à 0,5 μm . Ce processus est très conservé au cours de l'évolution et remplit de nombreuses fonctions physiologiques essentielles telles que la nutrition chez les amibes, le développement des organismes pluricellulaires, l'homéostasie et le remodelage tissulaire, ou encore l'immunité (**figure 28**). De ce fait, les mécanismes moléculaires fondamentaux qui soutiennent la phagocytose sont globalement transposables d'un modèle à l'autre, même s'ils peuvent varier légèrement au niveau des voies de signalisation impliquées. Au cours de cette introduction, je me focaliserai sur la phagocytose effectuée par les macrophages, des effecteurs du système immunitaire inné.

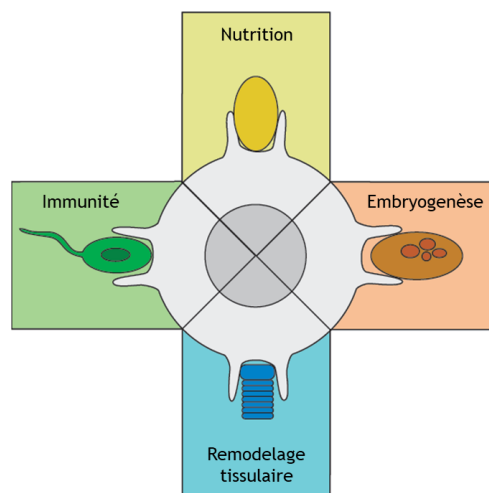


Figure 28 : Les différentes fonctions de la phagocytose
(Adapté de Desjardins et al., 2005)

Remplissant initialement un rôle nutritionnel chez les organismes unicellulaires comme les amibes, la phagocytose a acquis de nouvelles fonctions au cours de l'évolution. Chez les organismes pluricellulaires, la phagocytose permet tout d'abord l'élimination de cellules apoptotiques durant l'embryogenèse, et se poursuit ensuite au cours de la croissance et à l'âge adulte, afin d'assurer le remodelage des tissus. Enfin, chez les espèces animales, une dernière fonction apparaît : la défense contre l'invasion et l'infection par des organismes étrangers, et avec elle la notion d'immunité.

A. La phagocytose, un cas particulier d'endocytose

Le terme d'endocytose regroupe l'ensemble des voies impliquées dans l'internalisation de particules grâce à la formation de vésicules à partir de la membrane plasmique. Bien qu'elle comporte des spécificités propres, la phagocytose entre dans cette catégorie. L'endocytose dans sa globalité est un phénomène extrêmement dynamique, qui joue un rôle clé dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'homéostasie membranaire, l'activation de voies de signalisation ou la nutrition. C'est également la porte d'entrée de nombreux virus, parasites et toxines bactériennes, qui exploitent les voies d'endocytose pour infecter les cellules (Cossart et Helenius, 2014). Grâce à des mécanismes d'invagination ou d'évagination membranaire, ce phénomène aboutit à la formation de vésicules à la surface cellulaire. Celles-ci seront ensuite transportées de façon rétrograde jusqu'à atteindre divers compartiments cellulaires comme l'appareil de Golgi ou bien fusionner avec des lysosomes. Différents types d'endocytose peuvent être engagés, selon la taille des particules à ingérer et leur liaison à des récepteurs particuliers (figure 29). On distingue classiquement d'une part l'endocytose dépendante de la clathrine et d'autre part les voies clathrine-indépendantes, telles que l'endocytose médiée par la cavéoline, la macropinocytose et la phagocytose (Mayor et Pagano, 2007).

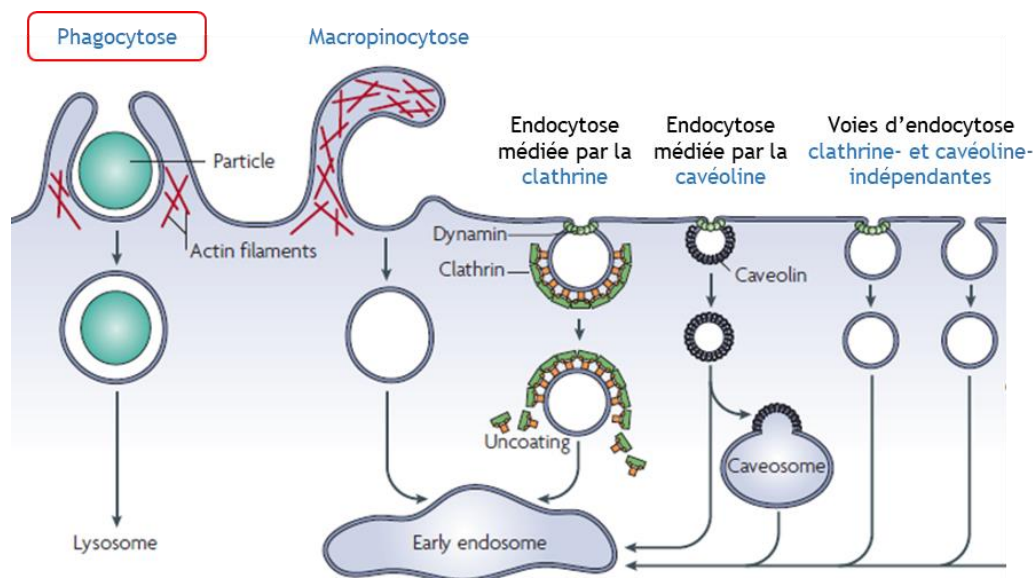


Figure 29 : Les principales voies d'endocytose dans la cellule
(Adapté de Mayor et Pagano, 2007)

La voie d'endocytose la plus empruntée est celle médiée par la clathrine ou endocytose clathrine-dépendante, qui génère des vésicules cagées d'environ 120 nm de diamètre. La deuxième voie d'endocytose est celle médiée par la cavéoline, formant des cavéoles de 60 nm de diamètre en moyenne. Des voies alternatives non dépendantes de la clathrine ni de la cavéoline permettent la formation de vésicules de 90 nm de diamètre environ. La macropinocytose génère des vacuoles de l'ordre du micromètre, grâce à des ruffles membranaires. Enfin, la reconnaissance de particules spécifiques de plus de 500 nm entraîne la phagocytose, qui se caractérise par l'émission d'extensions membranaires appelées pseudopodes, se rejoignant pour former un phagosome.

La phagocytose conduit à l'internalisation des particules de plus grand diamètre ($> 0,5 \mu\text{m}$), notamment *via* l'émission de pseudopodes, des extensions membranaires contenant un réseau de filaments d'actine néopolymérisés. Les pseudopodes vont entourer la particule et se rejoindre pour l'encercler au sein d'une vésicule appelée phagosome. Le phagosome subit ensuite des étapes de maturation qui aboutissent à la dégradation de son contenu.

B. Trafic membranaire au cours de la phagocytose

En plus du phénomène d'endocytose proprement dit, la phagocytose fait intervenir des phénomènes d'exocytose et de fusion avec différents compartiments membranaires (Braun et Niedergang, 2006). Cet important trafic membranaire est essentiel tout au long de la phagocytose, pendant la formation du phagosome mais également au cours de sa maturation.

Tout d'abord, la formation des pseudopodes nécessite un apport de membrane conséquent au niveau des sites de phagocytose, qui provient d'un phénomène d'exocytose focale (Booth *et al.*, 2001). Un certain nombre d'endomembranes, incluant les endosomes précoces et tardifs, les lysosomes et le RE, ont été proposées comme source de cet apport membranaire. Ces vésicules permettent également l'apport de molécules de signalisation régulant le processus ou participant à la réponse inflammatoire (Marion *et al.*, 2012). Les compartiments membranaires sont définis par des marqueurs moléculaires présents à leur surface, notamment les protéines des superfamilles des Rab et des SNARE. Or, différents éléments du complexe SNARE ont été impliqués dans les événements qui conduisent à la phagocytose, telles que la protéine VAMP3 présente sur les endosomes précoces et VAMP7 sur les endosomes tardifs (Huynh *et al.*, 2007). Enfin, durant la maturation du phagosome au sein de la cellule, des événements de fusion et de fission successifs se produisent avec des compartiments de la voie d'endocytose. Ces événements peuvent également être détectés par l'acquisition de marqueurs spécifiques comme certaines protéines SNARE ou Rab, ainsi que certains lipides dont le PI3P (Fairn et Grinstein, 2012).

II. Le macrophage, un acteur clé du système immunitaire inné

L'immunité est un moyen de protection d'un organisme animal contre les agents du non-soi, généralement pathogènes (bactéries, champignons, parasites...), qui menacent son équilibre. Les espèces animales possèdent ainsi un système immunitaire, qui se distingue en 2 types : inné ou adaptatif. Ces deux systèmes sont en étroite coopération et jouent un rôle majeur dans l'engagement de réponses immunitaires spécifiques. Le système immunitaire inné est chargé de répondre immédiatement face à un agent infectieux, et fait intervenir pour cela des cellules spécialisées faisant partie des leucocytes comme les cellules NK (*Natural killer*), des granulocytes neutrophiles ou encore les macrophages.

A. La découverte de la phagocytose dans les cellules de l'immunité innée

À la fin du XIX^{ème} siècle, le biologiste du développement Elie Metchnikoff a démontré le rôle fondamental d'une population de leucocytes dans la défense face à des corps étrangers, *via* un processus d'internalisation et de dégradation de particules, c'est à dire la phagocytose. Il appelle alors ces cellules des macrophages, et propose qu'au-delà de leur participation au développement et à l'homéostasie tissulaire, elles soient des effecteurs de l'immunité innée. Au vu de ces différents rôles, il émet également l'hypothèse que la fonction de la phagocytose ait évolué de « manger pour se nourrir » chez les amibes à « manger pour se protéger » chez les organismes plus complexes (Tauber, 2003). Les bases fonctionnelles de la phagocytose jetées par Metchnikoff ont contribué à la mise en place de la théorie cellulaire de l'immunité, opposée à l'époque à la théorie humorale. Ses travaux furent récompensés en 1908 par le prix Nobel de physiologie et de médecine, partagé avec Paul Ehrlich qui a de son côté développé la théorie de la réponse immunitaire adaptative, basée sur l'interaction entre les antigènes et les anticorps. Par la suite, d'importantes avancées ont été faites dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la phagocytose.

B. Les cellules phagocytaires du système immunitaire

Chez les mammifères, de nombreux types cellulaires possèdent des capacités de phagocytose. Les cellules spécialisées dans ce processus sont regroupées sous le terme de phagocytes (professionnels) ou cellules phagocytaires. Il existe également des phagocytes dits non professionnels tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, qui ont pour cible les corps apoptotiques (Bohdanowicz *et al.*, 2013). L'ensemble des phagocytes partagent comme caractéristiques la présence de récepteurs dits phagocytaires au niveau de leur membrane plasmique, qui reconnaissent des molécules spécifiques telles que les immunoglobulines (Ig), les facteurs du complément ou encore la PS. L'engagement de ces récepteurs va déclencher la signalisation de phagocytose menant à l'internalisation des particules.

La plupart des phagocytes sont issus de progéniteurs myéloïde dans la moelle osseuse. Ils comprennent les granulocytes neutrophiles, les cellules dendritiques et les monocytes. Ces derniers sont libérés dans la circulation sanguine et se différencient en macrophages lorsqu'ils migrent dans les tissus, où ils ont une demi-vie de plusieurs jours à plusieurs mois. Suivant leurs emplacements tissulaires, les macrophages prennent différentes appellations : cellules de Kupffer au niveau du foie, ostéoclastes au niveau des os, ou encore macrophages alvéolaires au niveau des poumons. Il est maintenant bien établi cependant que certaines populations de macrophages résidents dans les tissus ne sont pas issues en totalité de la moelle osseuse mais proviennent aussi des phases embryonnaires de peuplement des organes, telles que les cellules de Langerhans dans le tissu cutané ou les macrophages alvéolaires. C'est également le cas des cellules microgliales (ou microglie), des phagocytes « *macrophage-like* » qui ont la particularité d'être issus uniquement de

la phase embryonnaire (sac vitellin) et qu'on retrouve seulement au niveau du système nerveux central (Ginhoux et Williams, 2016). Ces cellules sont chargées d'éliminer les neurones surnuméraires au cours du développement, mais également les synapses non fonctionnelles, les plaques amyloïdes ou encore des agents pathogènes ayant traversé la barrière hématoencéphalique. Elles ont donc un rôle majeur dans le développement et l'homéostasie tissulaire au niveau neuronal (Mallat *et al.*, 2005).

Mis à part la microglie, les phagocytes sont surtout des effecteurs de l'inflammation, un phénomène permettant la défense immunitaire contre l'invasion par des organismes étrangers (Franc et White, 2000). La présence d'un microorganisme pathogène dans les tissus va ainsi induire la libération de signaux « de danger » qui vont attirer les phagocytes sur le site de l'infection. Une fois la phagocytose effectuée, ils contribuent au bon fonctionnement du système immunitaire inné et de son dialogue avec l'immunité adaptative. Par exemple, les cellules dendritiques sont spécialisées dans la présentation de l'antigène aux leucocytes circulants et le déclenchement de la réponse adaptative (Blander et Medzhitov, 2006). Par ailleurs, pour certaines cellules phagocytaires comme les neutrophiles, l'étape de digestion s'accompagne le plus souvent d'un stress oxydatif, c'est-à-dire d'une brutale élévation de la consommation cellulaire en oxygène et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces vont se concentrer dans le phagosome, où ils exercent des effets toxiques sur les micro-organismes phagocytés et participent à leur digestion.

C. *Caractéristiques des macrophages proprement dits*

1. *Fonctions et pathologies associées*

Tout comme les autres cellules phagocytaires, le macrophage remplit différentes fonctions médiées principalement par le processus de phagocytose.

Dans les organismes pluricellulaires, la phagocytose participe au remodelage des tissus au cours du développement ainsi qu'après la naissance. Durant l'embryogénèse, les macrophages ont pour fonction d'éliminer les cellules qui sont mortes par apoptose lors de la formation des organes (Penaloza *et al.*, 2006). Dans la vie courante, les macrophages jouent un rôle dans l'élimination de débris cellulaires et de cellules nécrotiques en cas de blessure (Krysko *et al.*, 2006). Ils contribuent aussi à l'angiogénèse, *via* l'absorption des composants de la matrice extracellulaire et la sécrétion de métalloprotéases, ainsi que de facteurs de signalisation ou de croissance. De ce fait, ils peuvent être associés au développement de cancers (Cassetta et Pollard, 2018). Les macrophages régulent également l'homéostasie lipidique, en contrôlant l'accumulation des lipides dans le foie par le biais entre autres de leurs récepteurs *scavengers*. On peut par exemple signaler qu'une ingestion trop élevée d'acides gras oxydés peut induire la formation de macrophages spumeux, étape décisive dans le développement de la sclérose en plaques par exemple (Lapenna *et al.*, 2018).

La fonction primordiale des macrophages reste la défense immunitaire, qui est tributaire de la réponse inflammatoire (Flannagan *et al.*, 2012). Néanmoins, leur contribution à l'inflammation ne se limite pas uniquement à la phagocytose. Ils possèdent également des capacités de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, qui amplifient l'inflammation en entraînant l'infiltration et l'activation de nombreuses autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes T. Un mauvais contrôle de cette production peut par ailleurs mener à une inflammation systémique, provoquant des dommages vasculaires irréversibles et une défaillance des organes, symptômes caractéristiques de la septicémie (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011). Enfin, ce sont des acteurs à l'interface avec l'immunité adaptative, participant à son élaboration grâce à la présentation des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II. Les peptides antigéniques résultant de la dégradation des agents pathogènes peuvent en effet être placés sur ce complexe membranaire et présentés aux lymphocytes T afin de déclencher une réponse immunitaire spécifique (Mantegazza *et al.*, 2013).

2. Les macrophages de la lignée RAW 264.7

La partie de mes travaux de thèse portant sur la phagocytose a été effectuée à partir de la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7. De par leur grande plasticité, ces cellules adoptent différentes morphologies en culture, mais présentent généralement des prolongements cytoplasmiques. Elles sont le plus souvent mononucléées et de taille importante (20 µm de diamètre en moyenne, pouvant s'étendre jusqu'à 60 µm en phagocytose). La lignée RAW 264.7 a été largement utilisée pour caractériser la machinerie moléculaire gouvernant la phagocytose, et les résultats obtenus ont pu être confirmés par la suite dans les macrophages primaires. Les cellules de cette lignée étant facilement transfectables par électroporation ou lipofection, elle représente un modèle de choix pour la surexpression de protéines de fusion ou l'utilisation d'ARN interférents.

Le processus de phagocytose peut être stimulé aisément dans ces cellules par l'ajout de particules telles que des billes de latex ou du zymosan, opsonisées ou non (figure 30). L'activation des récepteurs de surface avec ces particules déclenche des cascades de signalisation qui conduisent à l'internalisation de la particule dans un phagosome et à sa dégradation ultérieure. Chez cette lignée, la capacité de phagocytose a cependant tendance à diminuer graduellement avec le nombre de passage des cellules. Comparés à des macrophages en culture primaire, les macrophages RAW 264.7 présentent une phagocytose plus lente et une faible capacité de dégradation des particules organiques ingérées. Ceci peut être considéré comme un inconvénient dans l'étude du processus de maturation, mais peut au contraire se révéler être un avantage dans le cas de l'observation de la formation du phagosome, un processus extrêmement dynamique.

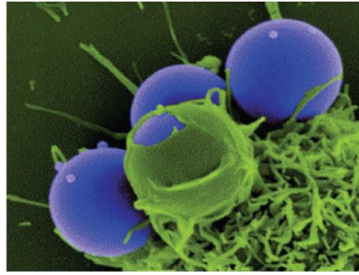


Figure 30 : Illustration de la formation du phagosome au cours de la phagocytose de billes de latex par un macrophage
(Huynh et al., 2007)

III. Mécanismes moléculaires de la phagocytose et rôles des lipides

Les nombreuses études portant sur la phagocytose ont permis de construire un modèle qui comprend les différentes étapes largement conservées de ce processus (**figure 31**). La phagocytose étant un mécanisme d'internalisation de particules de tailles importantes, ces étapes nécessitent des réarrangements massifs de divers compartiments cellulaires, afin d'aboutir à la formation d'une vésicule de grande taille dans laquelle la particule sera enfermée, dégradée, puis éventuellement recyclée.

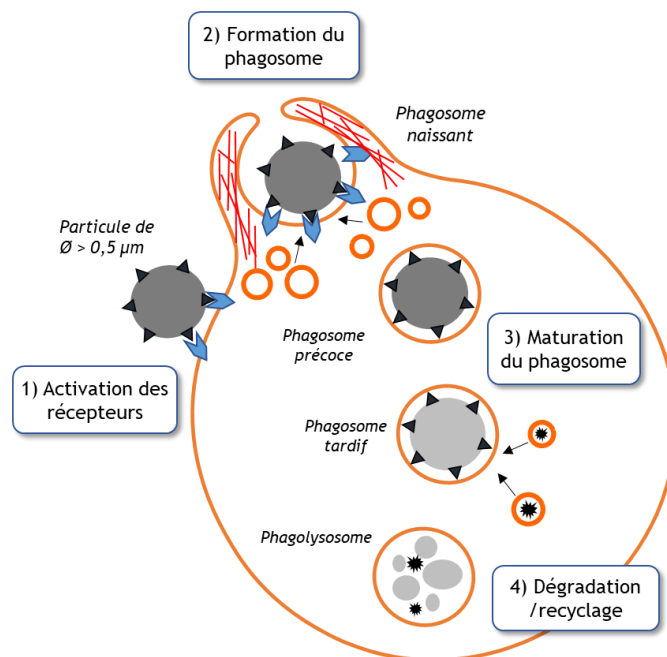


Figure 31 : Les principales étapes de la phagocytose

Le processus de phagocytose se compose de 4 grandes étapes : 1) Des motifs spécifiques sur la particule sont reconnus par les récepteurs phagocytaires, ce qui active des voies de signalisation ; 2) Ces voies conduisent à la formation d'un phagosome *via* un remodelage du cytosquelette d'actine ainsi qu'un apport membranaire au niveau du site d'interaction du macrophage avec la particule ; 3) Le phagosome précoce subit des phases de maturation le long de la voie d'endocytose et notamment des fusions avec des lysosomes ; 4) La particule est dégradée progressivement par les enzymes lytiques et les composants peuvent être recyclés, notamment pour être présentés *via* le CMH de classe II.

Suite à la reconnaissance de molécules sur les récepteurs phagocytaires, ceux-ci se regroupent pour permettre la transduction du signal. Les voies impliquées peuvent varier en fonction du type de récepteur qui déclenche la phagocytose. L'activation de plusieurs cascades de signalisation conduit à des réarrangements du cytosquelette, ainsi qu'un remodelage membranaire au niveau des sites d'interaction ligand-récepteur, entraînant l'extension de pseudopodes autour de la particule pour former une coupe phagocytaire. Lorsque les pseudopodes ont totalement entouré la particule, ils fusionnent grâce à un mélange d'activité contractile médiée par le cytosquelette d'actine, couplée à l'activité de la dynamine, et de réarrangements de la membrane (Araki, 2006 ; Marie-Anaïs *et al.*, 2016). Cela conduit à la formation d'un phagosome, qui est internalisé puis transporté sur les microtubules jusqu'à la région périnucléaire. Durant ce transport, le phagosome subit des étapes de maturation pour se transformer progressivement en phagolysosome, après différentes interactions avec la voie endolysosomale. Ce dernier compartiment permet la dégradation du contenu du phagosome. Il est caractérisé par un milieu vésiculaire acide, ainsi que la présence d'enzymes de dégradation et d'espèces réactives de l'oxygène (Stuart et Ezekowitz, 2008). Les peptides antigéniques issus de la dégradation peuvent être préservés et chargés sur le CMH de classe II afin d'activer les lymphocytes T, acteurs de l'immunité adaptative permettant une réponse spécifique (Mantegazza *et al.*, 2013). Les autres produits de dégradation seront recyclés comme nutriments ou rejetés par exocytose dans le cas de déchets. Enfin, en parallèle de ces étapes de trafic membranaire, l'activation des macrophages s'accompagne de la production de cytokines, de chimiokines, et de défensines qui participent à la réponse inflammatoire.

En résumé, la phagocytose peut être décomposée en deux phases principales : la formation du phagosome, suivie de sa maturation (Aderem et Underhill, 1999). Au vu de mon sujet d'étude, je me concentrerai sur la formation du phagosome, sans rentrer dans les détails de sa maturation ni la réponse intercellulaire médiée par l'activation des macrophages. Ce chapitre décrira les acteurs impliqués dans cette étape initiale, incluant le cytosquelette d'actine, les GTPases des familles Rho et Arf, et s'intéressera particulièrement au rôle des lipides.

A. Activation des récepteurs phagocytaires et déclenchement de la signalisation

1. Définition et catégories de récepteurs phagocytaires

La phagocytose est initiée suite à l'adhésion d'une particule sur les récepteurs phagocytaires présents au niveau de la membrane plasmique du macrophage. Cette interaction ligand-récepteur va déclencher des cascades de signalisation intracellulaires menant à l'internalisation de la particule. Parmi la grande variété des ligands reconnus, on trouve par exemple des motifs moléculaires consensus à la surface des bactéries tels que le mannose, les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes, ou bien la PS exposée à la surface des corps apoptotiques. Les particules peuvent également être recouvertes d'opsonines, des molécules

sécrétées par le système immunitaire qui recouvrent la particule cible et favorisent sa reconnaissance par différents types de récepteurs. Les phagocytes présentent ainsi un large éventail de récepteurs plus ou moins spécifiques de ces ligands, qui œuvrent en collaboration pour la détection et l'ingestion des particules (Underhill et Goodridge, 2012 ; Canton *et al.*, 2013).

La plupart des pathogènes ou corps apoptotiques, au vu de leur structure complexe, ne seront pas reconnus par un unique récepteur mais par la mobilisation de plusieurs types de récepteurs différents, dont la contribution dans la phagocytose sera variable (Stuart et Ezekowitz, 2005). Ainsi, tous les récepteurs engagés ne sont pas des récepteurs phagocytaires en tant que tels. Les récepteurs dits phagocytaires sont définis par leur capacité intrinsèque à induire l'internalisation d'une particule, lorsqu'ils sont exprimés en surface de cellules non phagocytaires (Freeman et Grinstein, 2014). En revanche, d'autres récepteurs de surface sont requis pour la reconnaissance du pathogène et coopèrent avec les récepteurs phagocytaires, mais leur action n'est pas suffisante pour déclencher la phagocytose. C'est par exemple le cas de la famille des récepteurs « *Toll-like* » (TLR), qui modulent l'efficacité de phagocytose, le devenir des particules internalisées et la réponse inflammatoire (Moretti et Blander, 2014).

Les récepteurs phagocytaires sont classés en deux catégories. La première comprend les récepteurs qui reconnaissent directement les particules à ingérer, par exemple les récepteurs *scavengers* (Prabhudas *et al.*, 2014). La seconde classe inclut des récepteurs apparus chez les mammifères, qui reconnaissent les particules par l'intermédiaire des opsonines. Les récepteurs aux opsonines les mieux caractérisés dans la littérature sont les récepteurs du complément (CR), ainsi que les récepteurs Fc (FcR). Ces deux types de récepteurs, bien que classés dans une même catégorie, induisent des voies de signalisation différentes (Swanson et Hoppe, 2004). Les récepteurs à opsonines de type FcR ont été les plus étudiés. De plus, au cours de nos travaux, nous avons stimulé la phagocytose *via* des Ig qui activent ce type de récepteur, afin notamment de visualiser l'extension des pseudopodes. Je me focaliserai ainsi dans ce chapitre sur le déroulement de la phagocytose suite à l'activation des FcR, notamment ceux de type gamma.

2. La famille des récepteurs Fc (FcR)

Les FcR sont des récepteurs transmembranaires qui permettent l'internalisation de particules opsonisées par des Ig, les constituants majoritaires des anticorps circulants, en se fixant à leur partie constante (Fc). La famille des FcR se subdivise en plusieurs classes selon le type d'Ig avec lesquelles les récepteurs interagissent. Les récepteurs Fc α et Fc ϵ se lient respectivement aux Ig de types A et E, tandis que les récepteurs Fc γ (Fc γ R) reconnaissent les Ig de types G (IgG). Les FcR sont classés en récepteurs de haute affinité (FcRI) ou de faible affinité (FcRII et FcRIII). Les premiers peuvent lier différents types d'Ig et permettent une transduction du signal dès la liaison d'une seule molécule, tandis que les seconds se lient exclusivement aux IgG, et nécessitent la liaison d'un complexe d'IgG afin de transmettre le signal (Nimmerjahn et Ravetch, 2008).

Le déclenchement de la phagocytose par les FcγR est le mieux étudié. Il existe 6 FcγR chez l'homme, qui présentent des affinités différentes pour les IgG (**figure 32**). Ils sont classés en deux types fonctionnels : les récepteurs FcγR dits « activateurs », qui possèdent un domaine intracellulaire « *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* » (ITAM) permettant la signalisation *via* des mécanismes de phosphorylation ; et les récepteurs FcγR dits « inhibiteurs » dont l'unique représentant est le FcγRIIB, qui possède un domaine intracellulaire « *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* » (ITIM), inhibiteur de la phosphorylation des tyrosines. Les FcγR activateurs sont constitutivement actifs à la surface des macrophages et se regroupent suite à la reconnaissance de complexes immuns pour initier le processus de phagocytose. Les FcγR inhibiteurs, quant à eux, modulent l'intensité de l'activation.

	Activating Fc receptors					Inhibitory Fc receptor
<i>Mouse</i>						
Structure						
Name	FcγRI	FcγRIII	FcγRIV	FcγRIIB		
Affinity	High	Low to medium	Low to medium	Low to medium		
<i>Human</i>						
Structure						
Name	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB	FcγRIIB
Affinity	High	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium
Alleles		FcγRIIA ^{139H} FcγRIIA ^{139R}		FcγRIIIA ^{158V} FcγRIIIA ^{158F}	NA1 NA2	FcγRIIB ^{232I} FcγRIIB ^{232T}

Figure 32 : La familles des récepteurs aux IgG (FcγR)

(Adapté de *Nimmerjahn et Ravetch, 2008*)

Les FcγR se lient à la fraction constante (Fc) des IgG. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, à l'exception du récepteur FcγRIIIB chez l'homme, qui possède une ancre GPI. On distingue deux types de récepteurs chez la souris et l'homme : les récepteurs activateurs possédant un domaine d'activation intracellulaire constitué d'un motif ITAM et les récepteurs inhibiteurs qui eux comportent un motif ITIM. La phosphorylation des tyrosines de ces motifs régule la signalisation en aval de ces récepteurs.

Les monocytes, macrophages et neutrophiles humains expriment les récepteurs activateurs FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32) et FcγRIIIA (CD16), ainsi que le récepteur inhibiteur FcγRIIB (*Nimmerjahn et Ravetch, 2008*). Chez les phagocytes murins, le récepteur FcγRIIA n'est pas exprimé alors qu'un récepteur spécifique FcγRIV est présent. L'utilisation de modèles murins dépourvus des gènes codants pour les FcγR a permis de mettre en évidence leur rôle crucial dans la réponse immunitaire contre les invasions microbiennes. Il a notamment été montré que la

délétion du gène codant le FcγRI chez la souris entraîne une inhibition de la phagocytose des complexes immuns formés par les IgG2a, ainsi qu'un défaut de présentation de l'antigène par le CMH, ce qui conduit à une réduction de la réponse inflammatoire (Ioan-Facsinay *et al.*, 2002 ; Bruhns et Jonsson, 2015). L'utilisation de ces modèles a également révélé la balance très importante entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs induits par le FcγRIIB. En effet, la délétion de ce dernier dans une lignée de macrophages murins entraîne une augmentation de l'internalisation des cibles opsonisées avec des IgG, mais également une réponse inflammatoire excessive conduisant au choc septique (Clatworthy et Smith, 2004).

3. Signalisation en aval des FcR

Suite à la fixation du ligand, plusieurs événements surviennent. Tout d'abord, une cascade de signaux aboutit à la phosphorylation des résidus tyrosine sur le domaine ITAM, par des membres de la famille des protéines kinases Src. Cette phosphorylation est suivie d'un recrutement de la kinase Syk, puis d'un regroupement des récepteurs. Enfin, elle entraîne l'activation de petites GTPases qui vont ensuite intervenir dans l'extension des pseudopodes caractéristiques de la phagocytose FcγR-dépendante (Niedergang et Grinstein, 2018).

a. Agrégation des récepteurs

Dans un premier temps, la liaison des Ig entraîne le regroupement des récepteurs phagocytaires. L'agrégation de ces récepteurs permet d'augmenter la liaison entre la particule et la membrane plasmique du phagocyte, mais aussi d'amplifier le signal intracellulaire par l'augmentation du nombre de récepteurs activés (Sobota *et al.*, 2005). Ce mode de recrutement des récepteurs a été appelé mécanisme en « fermeture éclair », du fait que les récepteurs seraient interconnectés au fur et à mesure de l'extension de la membrane plasmique autour de la particule. Par ailleurs, l'agrégation des FcR est à la base de la transduction du signal au cours de la phagocytose. Il semble en effet que la liaison du ligand au récepteur permette la phosphorylation des motifs ITAM dans les 15 secondes après activation, mais ne soit pas suffisante pour maintenir la signalisation (Paolini *et al.*, 1991 ; Benhamou *et al.*, 1993 ; Kiener *et al.*, 1993). Ainsi, plus il y a de récepteurs agrégés au cours de la phagocytose, par exemple à cause de la liaison d'une particule de grande taille, plus la transduction du signal sera importante. De plus, le groupe de Sergio Grinstein a pu montrer que dans le cas le plus physiologique où l'opsonisation d'une particule avec des IgG n'est pas réalisée de manière homogène, ce mécanisme de fermeture éclair est favorisé par l'activation des intégrines, qui réalisent un pontage entre la particule et la membrane du phagocyte (Freeman *et al.*, 2016). La diffusion latérale des récepteurs Fc est cependant limitée par le réseau de filaments d'actine corticale, qui immobilise des protéines transmembranaires jouant un rôle d'« enclos », comme par exemple CD44 (Freeman *et al.*, 2018).

b. Phosphorylation des récepteurs

Suite à l'agrégation des FcR, le domaine ITAM des récepteurs est phosphorylé par des protéines tyrosine kinases. Cette phosphorylation est requise pour initier la signalisation aboutissant à la polymérisation d'actine à la coupe phagocytaire (Lin *et al.*, 2016). Le maintien de cette signalisation nécessite par ailleurs l'exclusion des tyrosine phosphatases au niveau du site de phagocytose. Une étude récente a ainsi mis en évidence le rôle de la barrière créée par les intégrines et l'actine-F en anneau, qui empêchent la diffusion des phosphatases (notamment CD45) vers le centre de la région d'internalisation (Freeman *et al.*, 2016). Les FcγR ne possédant pas d'activité kinase intrinsèque, l'étape de phosphorylation requiert l'activité de tyrosine kinases de la famille Src, qui sont des facteurs clés dans la transduction du signal en aval des FcγR. L'activité de ces kinases transforme les motifs ITAM en plateformes de recrutement d'autres kinases telles que Syk ainsi que de protéines adaptatrices (Cox et Greenberg, 2001).

La famille des kinases Src est composée de 9 membres dont trois sont majoritairement exprimés dans les macrophages (Lyn, Hck, Fgr). Le rôle de ces kinases dans la transduction du signal en aval des FcγR a été montré dans des macrophages murins. Un défaut d'expression de ces kinases inhibe de 60% la phagocytose dépendante du FcγR dans ces cellules en entraînant notamment une diminution significative de l'activité de la kinase Syk connue pour être en aval de la cascade de signalisation, ainsi qu'un retard de la polymérisation d'actine à la coupe phagocytaire. En revanche, l'inactivation d'une seule des trois kinases Src n'est pas suffisante pour affecter drastiquement la phagocytose (Fitzer-Attas *et al.*, 2000 ; Majeed *et al.*, 2001). Parmi les Src, la protéine Hck est majoritairement exprimée dans les macrophages et comprend deux isoformes en quantités égales : p59Hck et p61Hck. Ces isoformes diffèrent par la présence de groupement acylés qui gouvernent leur localisation subcellulaire. La p59Hck est palmitoylée et est retrouvée constitutivement à la membrane plasmique. Il a été démontré que cette isoforme permet l'activation de la kinase Syk et régule la plasticité du cytosquelette d'actine après activation des FcγR dans les macrophages murins (Carréno *et al.*, 2002).

c. Recrutement et activation de la kinase Syk

La kinase Syk intervient en aval de la signalisation des kinases Src. Cette protéine a été identifiée en premier lieu comme interagissant *via* son domaine SH2 avec des tyrosines phosphorylées présentes sur les motifs ITAM des récepteurs des lymphocytes B activés (Johnson *et al.*, 1995). Cette kinase est également exprimée dans les macrophages, où elle joue un rôle majeur dans la cascade de signalisation menant à la polymérisation d'actine. Une étude dans les lymphocytes T a également montré à l'aide de l'expression d'une protéine de fusion que la protéine Syk est requise pour l'assemblage de l'actine et la phagocytose en aval des FcγR (Cox *et al.*, 1996). Ce résultat a ensuite été confirmé dans des macrophages : une fois les domaines ITAM du FcγR phosphorylés, Syk est recrutée rapidement à la membrane du phagosome en formation

via son domaine d'homologie aux protéines Src (SH2). De plus, la déplétion de cette kinase entraîne une diminution de la phagocytose dépendante du FcγR associée à un défaut de mise en place de la coupe phagocytaire (Crowley *et al.*, 1997 ; Kiefer *et al.*, 1998). Au cours de la phagocytose, les récepteurs deviennent très mobiles, ce qui favorise leur regroupement, et sont exclus de la région de polymérisation de l'actine. Une étude récente a révélé que l'activation de Syk amplifie le signal de phagocytose en restaurant la mobilité des récepteurs FcγR non engagés, en induisant le remodelage du cytosquelette d'actine au niveau du site de phagocytose (Jaumouillé *et al.*, 2014). Suite à ces cascades de phosphorylation, de nombreuses protéines adaptatrices sont mobilisées au site de phagocytose afin de recruter des enzymes du métabolisme lipidique, notamment celles régulant la formation des PIP.

B. Remodelage membranaire des PIP au site de phagocytose

L'un des mécanismes de régulation de la présence et de l'activité d'effecteurs protéiques impliqués dans un processus cellulaire particulier consiste à moduler l'activité d'enzymes de remodelage membranaire, afin de modifier l'environnement lipidique à un endroit précis, tel que le site de phagocytose. Ainsi, différents environnements lipidiques ont été caractérisés au niveau de la membrane du phagosome au cours des différentes étapes précoces de la phagocytose. Grâce à l'utilisation de senseurs spécifiques, la cinétique de production de divers types de PIP a par exemple été bien définie lors de la formation des phagosomes (Flannagan *et al.*, 2012). Le PI(4,5)P₂ est produit constitutivement à la membrane plasmique et est présent transitoirement sur le phagosome en formation, tandis que le PI(3,4,5)P₃ s'accumule plus tardivement sous la coupe phagocytaire et disparaît dès la fermeture du phagosome. Le PI3P, quant à lui, semble être présent sur le phagosome uniquement après la fusion des pseudopodes et l'internalisation de la particule. La présence successive de ces lipides permettrait alors le recrutement membranaire de protéines comportant des domaines de liaison aux PIP (domaines PH, FYVE ou PX) de façon précise au cours du temps et l'espace. De nombreuses études ont montré le rôle crucial joué par les PIP au cours de la phagocytose induite par les FcγR, dans les étapes de formation du phagosome comme de sa maturation. Parmi les kinases contrôlant la production des différents PIP au cours de la phagocytose, on trouve les PIP 3-kinases (PI3K) de classe I et III qui produisent respectivement le PI(3,4,5)P₃ à partir du PI(4,5)P₂, et le PI3P. Une première évidence de l'implication de ces PIP dans la formation du phagosome provient de l'utilisation d'inhibiteurs des PI3K, qui bloquent la phagocytose de particules opsonisées par des IgG dans les macrophages. De façon intéressante, la polymérisation d'actine à la base de la coupe phagocytaire se poursuit en présence des inhibiteurs, suggérant que ce phénomène est indépendant de l'activité des PI3K (Araki *et al.*, 1996 ; Cox *et al.*, 1999). Néanmoins, l'inhibition spécifique des kinases originaires de la production des PIP joue un rôle important dans l'extension des pseudopodes et la fermeture du phagosome (Vieira *et al.*, 2001). Les fonctions spécifiques de ces lipides dans le processus de formation du phagosome restent cependant à clarifier (Botelho *et al.*, 2004)

Dans les macrophages quiescents, le PI(4,5)P₂ est majoritairement localisé au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, ainsi que dans l'appareil de Golgi en moindres proportions. Suite à l'activation des FcγR, une augmentation locale des niveaux de ce lipide a été observée au niveau de la coupe phagocytaire formée par les pseudopodes en extension. La production de ce lipide est médiée en partie par l'activité de la PI4P5K (Coppolino *et al.*, 2002). Les trois isoformes de la PI4P5K sont recrutées au cours de l'extension des pseudopodes, grâce à des interactions électrostatiques (Fairn *et al.*, 2009). Des protéines comprenant des domaines PH, telles que la gelsoline et la cofiline qui jouent un rôle dans la dynamique des filaments d'actine, sont susceptibles d'être recrutées au site de phagocytose *via* leur liaison au PI(4,5)P₂. Ce phosphoinositide pourrait ainsi jouer un rôle dans le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire à l'extension des pseudopodes (Scott *et al.*, 2005). Puis, le PI(4,5)P₂ disparaît progressivement de la base de la coupe phagocytaire avant la fermeture du phagosome, en parallèle de la clairance de l'actine filamentaire (Botelho *et al.*, 2000). Cette diminution rapide des niveaux de PI(4,5)P₂ est due à la combinaison de l'activité de plusieurs types d'enzymes.

Une partie du PI(4,5)P₂ est par exemple convertie en PI(3,4,5)P₃, un lipide très peu présent dans les macrophages au repos. Suite au recrutement et à l'activation de la PI3K au site de phagocytose, ce lipide est produit sous la coupe phagocytaire, et disparaît après son internalisation (Marshall *et al.*, 2001). Le PI(3,4,5)P₃, tout comme le PI(4,5)P₂, interagit avec les domaines PH des protéines, et pourrait jouer un rôle dans le recrutement de Btk, une tyrosine kinase capable de phosphoryler la PLC et de stimuler ainsi la production du DAG (Cantrell, 2001). De plus, le PI(3,4,5)P₃ pourrait réguler la présence et l'activation de protéines nécessaires à la réorganisation du cytosquelette durant la phagocytose comme la protéine WAVE, qui permet la régulation du complexe Arp2/3 (Oikawa *et al.*, 2004).

La disparition du PI(4,5)P₂ avant la fermeture du phagosome est également concomitante à l'apparition de DAG, issu de l'activité de la PLC qui a été recrutée au site de phagocytose. Par ailleurs, le DAG formé peut lier des protéines contenant des domaines C1 comme la PKC, qui apparaît au niveau des phagosomes naissants en même temps que le DAG et est connue pour jouer un rôle au cours de la phagocytose (Larsen *et al.*, 2000). Enfin, le PI(4,5)P₂ peut également être déphosphorylé par les phosphatases INPP5B (*inositol polyphosphate-5-phosphatase B*) et OCRL (*oculocerebrorenal syndrome of lowe*). La métabolisation du PI(4,5)P₂ à la membrane plasmique au cours de la formation du phagosome est essentielle à l'internalisation des particules reconnues par les FcγR. En effet, l'inactivation de la protéine homologue d'OCRL chez l'amibe, Dd5P4, entraîne une inhibition de la phagocytose (Loovers *et al.*, 2007). Une étude réalisée à partir de macrophages humains n'exprimant plus Bcl10 a démontré le rôle essentiel de cette protéine dans le trafic vésiculaire d'OCRL jusqu'au site de phagocytose. La mise en contact de ces macrophages avec des érythrocytes opsonisés par des IgG induit ainsi la formation d'une coupe phagocytaire abortive, riche en PI(4,5)P₂ et en actine-F (Marion *et al.*, 2012).

Enfin, le PI3P a été détecté après la fermeture et l'internalisation du phagosome. Il pourrait être formé par l'activité de différents types de PI3K (Vieira *et al.*, 2001). Ce lipide est quant à lui capable d'interagir avec des domaines protéiques de type FYVE et PX. Il pourrait ainsi être à l'origine du recrutement de EEA1 (*early endosomal antigen 1*), un marqueur des endosomes précoces important pour la maturation du phagosome (Fratti *et al.*, 2001).

Les mécanismes de formation des phagosomes sont rappelés dans les introductions des deux articles suivants, ainsi que les données bibliographiques qui attestent de l'implication de la PLD et du PA dans les étapes précoces de la phagocytose.

Publication 1 :

Caractérisation de senseurs moléculaires du PA et observation de la dynamique du PA durant la phagocytose

I. Objectifs de l'étude

Bien que les fonctions pléiotropiques du PA ainsi que ses voies métaboliques commencent à être bien déterminées, nous disposons de peu d'informations quant à la localisation subcellulaire de ce lipide et à sa dynamique de formation dans les cellules vivantes. Ces lacunes sont dues majoritairement à un manque d'outils permettant de localiser le PA au sein des cellules.

Même si les moyens d'étude des lipides sont globalement moindres par rapport aux protéines, d'autres lipides que le PA ont bénéficié de plus de possibilités d'observation. C'est le cas par exemple de phosphoinositides comme le PI(4,5)P₂, ainsi que du DAG, pour lesquels des senseurs moléculaires ont été développés et largement utilisés pour examiner en temps réel leur production dans les cellules (Lemmon, 2008). Ces sondes ont été établies grâce à l'identification d'un domaine de liaison caractéristique sur les protéines cibles de ces lipides. En effet, le PI(4,5)P₂ est capable d'interagir avec les protéines possédant un domaine PH, tandis que le DAG peut se lier au domaine C1 des kinases telles que les PKC. La présence de ces séquences consensus a facilité la production de sondes spécifiques du PI(4,5)P₂ ou du DAG, qui ont notamment permis de visualiser leur dynamique de production au cours de la formation des phagosomes.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction générale, le PA est également capable de se lier à des protéines afin de les recruter dans un domaine membranaire ou bien de les activer (partie III.B.). Cependant, contrairement aux exemples cités précédemment, aucune séquence consensus n'a pu réellement être mise en évidence entre les différentes protéines interagissant avec le PA (Bruntz *et al.*, 2014a, voir tableau 2). Parmi ces protéines cibles, certaines se lient au PA *via* leur domaine PH comme la protéine SOS, mais la majorité contient plutôt un domaine de liaison au PA (PABD) plus ou moins défini, qui ne ressemble pas à un motif connu. Des similitudes ont cependant été recensées entre les PABD, comme une forte proportion d'acides aminés basiques ainsi que la présence d'acides aminés hydrophobes sur un fragment peptidique adoptant une configuration en hélice α (Tanguy *et al.*, 2018a). Depuis l'identification de ces PABD, quelques sondes du PA ont pu être développées à partir d'effecteurs protéiques identifiés chez les levures (Spo20p, Opi1p) et les mammifères (Raf1, PDEA4A1). L'utilisation de ces sondes dans les cellules vivantes a déjà contribué à des avancées non négligeables dans la compréhension du mode de fonctionnement des PLD dans les processus de trafic membranaire (Corrotte *et al.*, 2006 ; Zeniou-Meyer *et al.*, 2007).

L'hétérogénéité observée au niveau des séquences d'acides aminés des PABD implique que chacun d'entre eux ait potentiellement une affinité propre pour le PA. De plus, certaines des sondes utilisées pour détecter le PA se localisent dans des compartiments cellulaires différents, tels que les PABD des protéines Spo20p, Opi1p et PDE4A1 décrits dans l'introduction (partie III.B.3.). Exprimés dans des cellules au repos, ces PABD se retrouvent concentrés principalement dans le noyau, le RE ou l'appareil de Golgi. La description initiale de la distribution cellulaire de chaque senseur ayant été effectuée dans des lignées différentes de cellules de mammifères ou bien dans les levures, ces différences de localisation pourraient s'expliquer par des spécificités propres au type cellulaire utilisé. Cependant, ces variations pourraient aussi très bien révéler une liaison sélective de chacune des trois sondes à certaines espèces de PA et/ou à un environnement membranaire particulier.

Notre étude avait ainsi pour premier objectif d'établir les caractéristiques de la liaison de ces trois senseurs moléculaires au PA, en identifiant les facteurs physico-chimiques influençant l'affinité des sondes pour ce lipide. Pour cela, nous avons effectué une première phase de tests *in vitro* à l'aide des différents PABD exprimés sous forme de protéines recombinantes fusionnées à la glutathion S-transférase (GST). Nous avons mesuré la liaison des sondes avec des liposomes grâce à une nouvelle méthode fluorescente semi-quantitative développée au laboratoire. L'utilisation des liposomes nous a permis de quantifier la liaison des sondes avec un environnement membranaire particulier, dont nous avons fait varier plusieurs paramètres incluant la courbure, la charge, et l'état de compactage des lipides. En incorporant dans ces liposomes des PA contenant des chaînes d'acides gras de longueur et de degré d'insaturation variables, nous avons également mesuré l'affinité des sondes en fonction de la nature du PA présent.

Dans une deuxième phase de cette étude, nous avons entre autres visualisé la distribution intracellulaire de ces sondes dans un même type cellulaire. Cette phase avait pour objectif de vérifier si la localisation spécifique des sondes était en lien avec leurs paramètres d'affinité au PA, mais également d'étudier le comportement de ces senseurs dans un processus cellulaire, ici au cours de la phagocytose. Nous avons ainsi fait exprimer des constructions comportant les PABD fusionnés à la GFP dans la lignée de macrophages murins RAW 264.7 et déterminé leur localisation subcellulaire par immunocytochimie. Le comportement de ces sondes durant la phagocytose a également été observé à l'aide d'un protocole de phagocytose frustrée, qui induit la signalisation de phagocytose, alors que l'internalisation de la particule reconnue est rendue impossible. Ces observations ont été combinées avec une approche originale de spectroscopie de masse permettant d'analyser la proportion des différentes espèces de PA dans chaque compartiment membranaire, afin de rechercher une corrélation entre les données obtenues *in vitro* et *in cellulo*. Nous avons ainsi pu obtenir des informations intéressantes sur le métabolisme du PA lors de la phagocytose et les formes de PA potentiellement impliquées dans ce processus.

Plus largement, ces données ont permis de confirmer l'intérêt des senseurs du PA dans la compréhension de la dynamique spatio-temporelle de ce lipide au cours des processus de trafic membranaire.

Les sondes utilisées ont été conçues par Nawal Kassas, une précédente doctorante de l'équipe, qui avait déjà entamé leur caractérisation au cours de sa thèse. Pour mener à bien cette étude, j'ai pris en charge la culture et les expériences sur les macrophages RAW 264.7. J'ai réalisé les expériences d'immunofluorescence, les analyses en microscopie confocale, ainsi que les immunoblots sur les fractions de membrane. J'ai également participé aux tests de liaison sur les liposomes, bien que la majorité de ces tests ait été effectuée avant mon arrivée, tout comme les analyses de lipidomique.

II. Résultats

Les résultats obtenus sont exposés dans la publication que vous trouverez à partir de la page suivante, et que je signe en deuxième auteur :

Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis.

Kassas N., Tanguy E., Thahouly T., Fouillen L., Heintz D., Chasserot-Golaz S., Bader M.-F., Grant N. J., and Vitale N.

Journal of Biological Chemistry, 2017 Mar; 292(10):4266-4279

Comparative Characterization of Phosphatidic Acid Sensors and Their Localization during Frustrated Phagocytosis*

Received for publication, December 12, 2016, and in revised form, January 20, 2017. Published, JBC Papers in Press, January 23, 2017, DOI 10.1074/jbc.M116.742346

Nawal Kassas[‡], Emeline Tanguy[‡], Tamou Thahouly[‡], Laetitia Fouillen[§], Dimitri Heintz[¶], Sylvette Chasserot-Golaz[‡], Marie-France Bader[‡], Nancy J. Grant[‡], and Nicolas Vitale^{‡,¶1}

From the [‡]Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 CNRS and Université de Strasbourg, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, the [§]Laboratoire de Biogénèse Membranaire, UMR-5200 CNRS, Plateforme Métabolome, Université de Bordeaux, 33883 Villenave D'Ornon, and the [¶]Plateforme Métabolomique, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR-2357 CNRS and Université de Strasbourg, Institut de Botanique, 28 Rue Goethe, 67083 Strasbourg, France

Edited by George M. Carman

Phosphatidic acid (PA) is the simplest phospholipid naturally existing in living organisms, but it constitutes only a minor fraction of total cell lipids. PA has attracted considerable attention because it is a phospholipid precursor, a lipid second messenger, and a modulator of membrane shape, and it has thus been proposed to play key cellular functions. The dynamics of PA in cells and in subcellular compartments, however, remains an open question. The recent generation of fluorescent probes for PA, by fusing GFP to PA-binding domains, has provided direct evidence for PA dynamics in different intracellular compartments. Here, three PA sensors were characterized *in vitro*, and their preferences for different PA species in particular lipidic environments were compared. In addition, the localization of PA in macrophages during frustrated phagocytosis was examined using these PA sensors and was combined with a lipidomic analysis of PA in intracellular compartments. The results indicate that the PA sensors display some preferences for specific PA species, depending on the lipid environment, and the localization study in macrophages revealed the complexity of intracellular PA dynamics.

Phosphatidic acid (PA)² has emerged as a new class of lipid mediators involved in diverse cellular functions through either structural or signaling modes of action. Structural PA is a precursor of glycerophospholipids (1). In mammals, structural PA is synthesized through two successive acylation reactions and can then be converted by phosphatidic acid phosphohydrolase to diacylglycerol (DAG), which is an important source for the biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids (2). Three alternative biosynthetic pathways produce signaling PA (2).

* This work was supported by grants from “La Ligue Contre le Cancer” and from “Fondation pour la Recherche Médicale” (to N.V.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail: vitalen@unistra.fr.

² The abbreviations used are: PA, phosphatidic acid; DAG, diacylglycerol; DGK, diacylglycerol kinase; DOPC, dioleoyl phosphatidylcholine; ER, endoplasmic reticulum; LBB, liposome-binding buffer; LPAAT, lyso-PA-acyltransferase; NBD, *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl); PABD, PA-binding domain; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI(4,5)P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLD, phospholipase D; POPC, palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; MRM, multiple reaction monitoring.

The first involves phospholipase D (PLD), which catalyzes the hydrolysis of the distal phosphodiester bond in phosphatidylcholine to form PA and choline. Phosphorylation of diacylglycerol by DAG kinase (DGK) constitutes the second pathway to produce PA, and acylation of lyso-PA by lyso-PA-acyltransferases (LPAAT) constitutes the third. The complexity and diversity of the PLD, DGK, and LPAAT families suggest that they are involved in specific cellular functions that are probably not redundant. Signaling PA generated by these three enzymes has been implicated in cytoskeletal organization, cell survival and proliferation, and membrane and vesicle trafficking (3). Yet, because PA is implicated, either directly or indirectly, in the biosynthesis of most phospholipids and triacylglycerols, its potential signaling functions may not be mutually exclusive from its intermediate biosynthetic role.

At the molecular level, PA has been found to interact with or regulate at least 50 different partners present in all organisms from yeasts and plants to mammals (4). These include GTPases, kinases, phosphatases, nucleotide-binding proteins, and phospholipases (4). PA is a negatively charged phospholipid with a very small headgroup, which imposes a cone-shaped structure that can potentially affect membrane curvature (5, 6). Thus, the search for a PA-binding motif among PA effectors is hampered by the fact that it is not always clear whether a given protein has specific affinity for PA or just an overall affinity for a negatively charged membrane topology. Hence, analyses of PA-binding polypeptide fragments have led to the idea that the only feature related to PA binding is a short stretch of positively charged residues (4). The actual view is that PA effectors do not contain a well defined PA-recognition structural motif, but use either positively charged or surface-exposed hydrophobic residues, or a combination of both for binding to PA.

In analogy with other lipid-signaling reactions, the interaction of proteins with PA often triggers their translocation from the cytosol to a specific membrane sub-compartment. However, PA can also directly regulate the activity of enzymes and trans-membrane proteins (7). For example, reconstitution studies have shown that PA inhibits the activity of the sarcoplasmic reticulum ATPase (8) and modulates the gating kinetics of potassium channels (9, 10). PA can also regulate small GTPases by modulating their regulatory proteins, guanine nucleotide exchange factors, and GTPase-activating proteins

(11). In terms of localization as well as function, PA effectors are found in almost all cellular compartments and are associated with a variety of cellular functions, although many of them regulate actin dynamics and membrane trafficking (3, 4, 7).

To date, the number of PA-specific probes that can be employed to gain insight into the localization and function of PA-binding proteins and/or image dynamics of PA pools in living cells is rather limited. Probes derived from the PA-binding domains (PABD) of the yeast protein Spo20p and Raf1 have been the most widely used. When expressed in cells, PABDs often localize to different subcellular compartments. For instance, the PABD of Spo20p (Spo20p-PABD) has been mostly described in the nucleus and plasma membrane in mammalian cells (6, 12), whereas the PABD of the yeast protein Opi1p (Opi1p-PABD) is reported to shuttle between the endoplasmic reticulum (ER) and the nucleus (13), and the PABD of the mammalian protein PDE4A1 (PDE4A1-PABD) is often found associated with the Golgi apparatus (14). Although it cannot be excluded that these different localizations result from cell-specific expression, it may also suggest that PA probes are able to sense different pools of PA in a specific environment (15). To probe this idea, we performed an *in vitro* characterization and comparison of the Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 PA sensors using a novel semi-quantitative assay. Using macrophages as a cell model, we then investigated the intracellular distribution of the three PABDs and quantified the corresponding PA levels by mass spectrometry analysis. Macrophages internalize and eliminate pathogens and cellular debris using a membrane trafficking process known as phagocytosis. A number of intracellular organelles, including endosomes (16), lysosomes (17), ER (18, 19), and Golgi (20) have been reported to contribute to the formation of the phagosome membrane during particle engulfment. At the molecular level, PLD has been described to be necessary for the formation and maturation of phagosomes along with efficient Fc γ receptor-mediated phagocytosis and has been identified on phagocytic pseudopods that engulf particles (21–24). A comparison of unstimulated macrophages with those undergoing frustrated phagocytosis revealed that the three PABDs are useful tools to localize and distinguish variations in PA levels and species in subcellular compartments.

Results

PABDs of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 Preferentially Bind to PA—In the attempt to characterize and compare biosensors for PA, we prepared GST fusion proteins composed of the PABD of Spo20p (fragment 50–91), Opi1p (fragment 103–191), and PDE4A1 (fragment 1–40). These PABDs were expressed in *Escherichia coli* as GST fusion proteins and purified, and their interaction with PA was probed using a phospholipid overlay assay. The three PABDs displayed a strong preference for PA over other anionic lipids, at least in a non-membranous environment (Fig. 1A). As well, experiments performed with phospholipids inserted in a membrane using liposome flotation confirmed that the three sensors retained their preference for PA over PI(4,5)P₂ (Fig. 1B) and PS, another anionic phospholipid (data not shown).

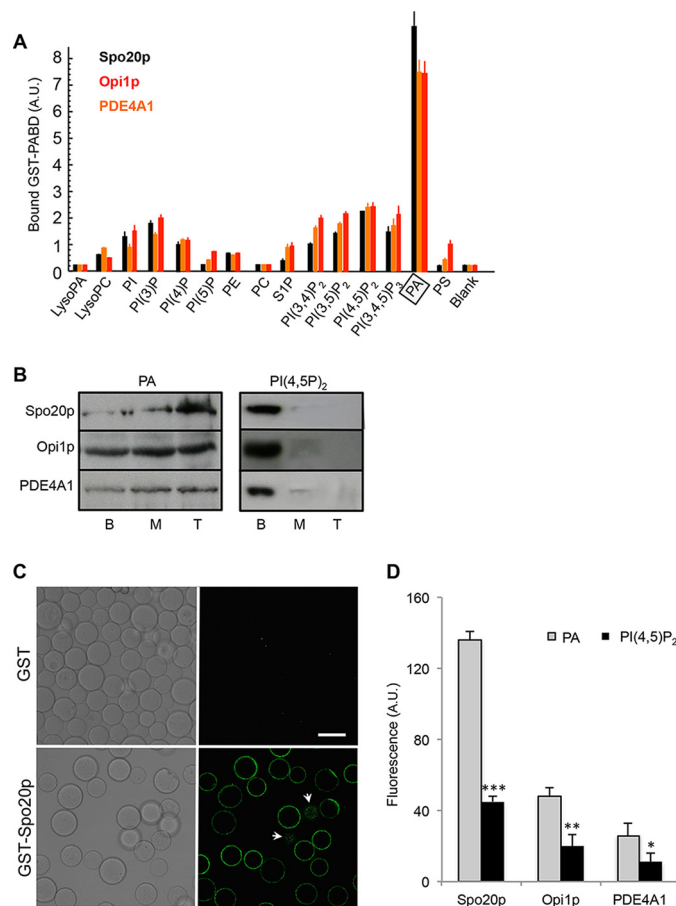


FIGURE 1. Spo20p-PABD, Opi1p-PABD, and PDE4A1-PABD preferentially bind to PA. A, quantification of Spo20p-PABD, Opi1p-PABD, and PDE4A1-PABD binding to phospholipids on nitrocellulose membrane strips (means \pm S.E., $n = 4$ independent experiments). The binding to GST alone was less than 0.1 A.U., and this background was subtracted from samples. A preference for PA (boxed) was observed for all of these probes. B, liposome flotation assay. To further validate PA specificity for Spo20p-PABD, Opi1p-PABD, and PDE4A1-PABD, each GST probe was incubated with LBB buffer containing fluorescent liposomes (5% PE-NBD, 85% DOPC, and 10% PA, or PI(4,5)P₂) and separated on a sucrose density gradient by ultracentrifugation. Equal volumes of the top (T), middle (M), and bottom (B) layers were run on SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-GST antibody. More than 95% of the fluorescence was recovered in layers M and T indicating the presence of liposomes in these fractions ($n = 3$ independent experiments). C, confocal images of GST and GST-Spo20p-PABD coupled to GSH-Sepharose beads after incubation with liposomes (5% PE-NBD, 85% DOPC, and 10% PA). Fluorescent liposomes accumulated on the surface of GST-Spo20p-PABD beads. Arrows indicate dots of fluorescence on the bottom or top of beads. Bar, 50 μ m. D, semi-quantitative fluorescent liposome assays with GST-PABD beads and liposomes (5% PE-NBD, 85% DOPC, and 10% PA or PI(4,5)P₂). A 10-fold molar excess of PA or PI(4,5)P₂ relative to that of GST-PABD was used. Binding of liposomes to GST-PABD beads was estimated by measuring the total fluorescence and subtracting the background (see under "Materials and Methods"). Fluorescence measured when liposomes were incubated with GST alone was around 3 A.U. and was subtracted. Results are presented as means \pm S.D. (triplicate measurements pooled from three experiments, *, $p > 0.05$; **, $p > 0.01$; and ***, $p > 0.001$).

To monitor PA binding of the three GST-PABDs in a lipid environment, we developed a semi-quantitative *in vitro* assay using NBD-labeled liposomes. As shown by confocal microscopy analysis (Fig. 1C), PA-containing fluorescent liposomes specifically bound to GST-Spo20p-PABD linked to GSH-Sepharose beads but not to control GST linked to GSH-Sepharose beads. Based on this observation, the binding of fluorescent liposomes (5% PE-NBD, 85% PC, 10% PA, or PI(4,5)P₂) to GST-

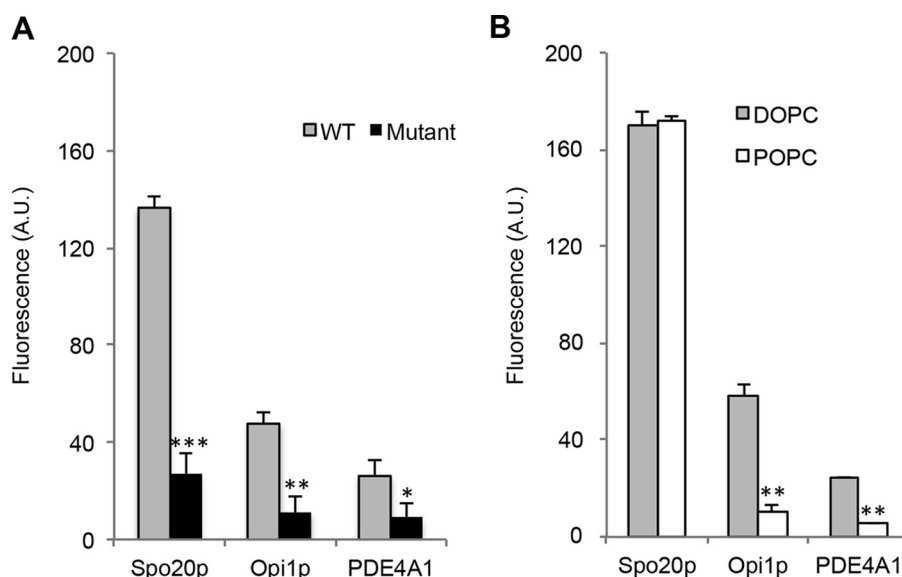


FIGURE 2. Effect of lipid packing defects on Spo20p-PABD, Opi1p-PABD, and PDE4A1-PABD binding to PA. *A*, semi-quantitative fluorescent liposome assays with wild-type GST-PABD beads or mutated Spo20p-PABD-(PL67P) beads, Opi1p-PABD-(K126M/R127G) beads, PDE4A1-PABD-(K25A/R26A) beads, and liposomes (5% PE-NBD, 85% DOPC, 10% PA). Results are presented as means \pm S.D. (of triplicate measurements pooled from three experiments, *, $p > 0.05$; **, $p > 0.01$; and ***, $p > 0.001$). *B*, semi-quantitative fluorescent liposome assays with GST-PABD beads and liposomes with variable packing defects. GST-PABD beads (330 pmol) bound to GSH beads were incubated with liposomes containing 5% PE-NBD and 85% DOPC or POPC, in addition to 10% PA (16:0/22:06). Results are presented as means \pm S.D. (of triplicate measurements from a representative experiment, $n = 3$; **, $p > 0.01$).

PABDs linked to GSH-Sepharose beads was monitored by fluorimetry. Although significant binding of PI(4,5)P₂ containing liposomes to the three PABDs was detected, our observations clearly indicated a preferential binding of the PA liposomes over the PI(4,5)P₂ liposomes in all cases (Fig. 1D). When comparing PA binding to the three PABDs, it appears that Spo20p-PABD is by far the most potent PA sensor (Fig. 1D). The binding of the PA-containing liposomes to the PABDs was greatly reduced by specific point mutations in the PABD affecting either the α -helical conformation (Spo20p-PABD) or the positive charge clusters (Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD) (Fig. 2A), indicating that the interaction depended partially on electrostatic interaction but also on the structural conformation of the PABD.

PABDs of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 Are Sensitive to the Local Lipid Environment and to PA Species—In a second series of experiments, the influence of the lipid composition was examined using fluorescent liposomes composed of PC with variable degrees of saturation and a polyunsaturated form of PA (16:0/22:6). Two types of liposomes were used as follows: liposomes made with unsaturated PC (dioleoyl-PC, DOPC), and liposomes made with PC having one saturated fatty acyl chain (palmitoyl-oleoyl-PC, POPC). As shown in Fig. 2B, the two types of liposomes bound preferentially to Spo20p-PABD compared with Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD. However, binding to Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD was sensitive to the PC composition of the liposomes. POPC/PA and DOPC/PA liposomes bound equally well to Spo20p-PABD, but POPC liposomes were much less effective than DOPC liposomes in binding to Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD (Fig. 2B), suggesting that PA binding capacity of Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD was sensitive to the PC nature present in liposomes. Unsaturated fatty acyl chains have a conical shape that creates lipid-packing defects in membranes (25). Together these obser-

vations suggest that Spo20p-PABD displays a higher affinity for PA compared with Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD. However, Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD are able to sense PA and changes in its lipid environment in the membrane, which is less the case for Spo20p.

We then examined the PA-binding specificity of the PABDs using liposomes containing PA species with different fatty acid chains varying in length and saturation. All three PABDs showed an overall preference for long and unsaturated fatty acid chains, with Spo20p-PABD displaying in general a higher affinity (Fig. 3). However, differences in the relative PA preferences were noted. Mono- and bis-unsaturated PAs in the *sn*-2 position appeared to bind preferentially to the Spo20p-PABD and PDE4A1-PABD, but no such preference could be seen for Opi1p-PABD (Fig. 3). Of note, in contrast to Opi1p-PABD, Spo20p-PABD and PDE4A1-PABD displayed reduced binding of polyunsaturated PA (Fig. 3). Increasing the *sn*-1 chain length from 16 to 18 carbons increased the binding to Spo20p-PABD, whereas it reduced the binding to Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD. PA(18:0/18:1) displayed the most potent binding to Spo20p-PABD, whereas PA(16:0/18:1) was preferred by PDE4A1-PABD (Fig. 3). The influence of the acyl chain length on PA binding was tested using bi-saturated PA because of limited commercial availability of these PA species (Fig. 3D). The shortest PA tested, PA(8:0/8:0), bound equally well to all three probes, but as the length of the acyl chain increased, Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD bound less, whereas Spo20p-PABD bound more (Fig. 3D), suggesting that the probes differed in specificity regarding the acyl chain length of PA. Altogether, these observations suggest that the three PA sensors display a specific PA preference profile in terms of length and saturation of the acyl chains and may be useful for sensing distinct PA species within membranes.

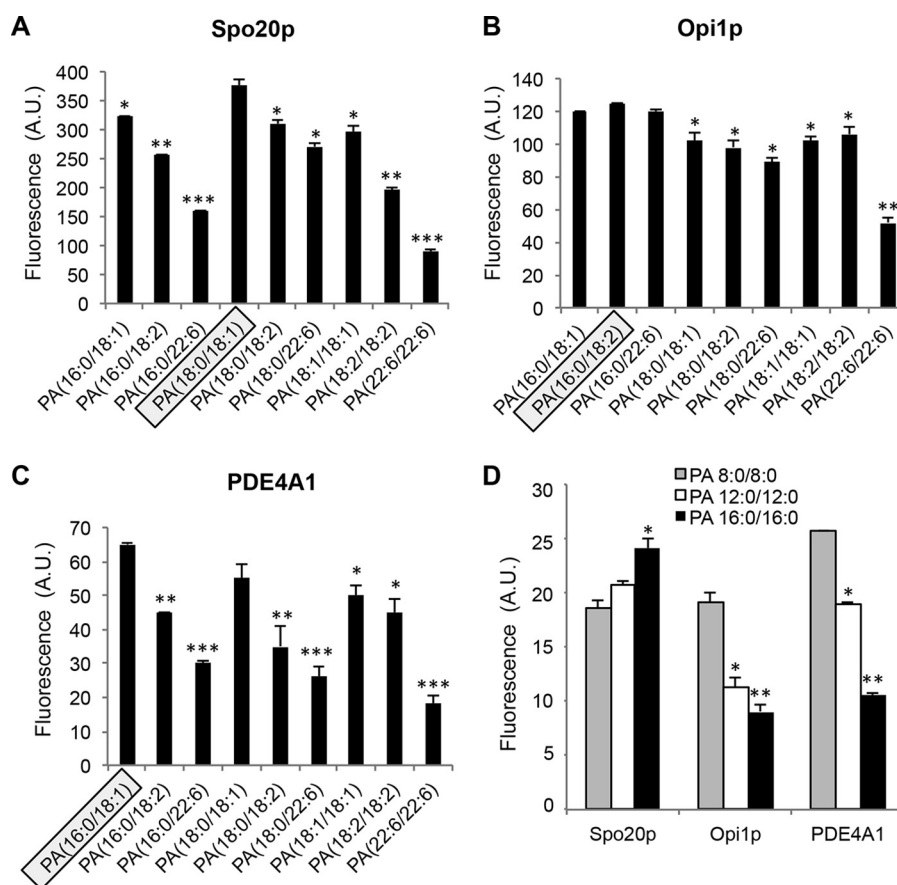


FIGURE 3. **Effect of PA fatty acyl chain composition on PA binding of Spo20p-PABD, Opi1p-PABD, and PDE4A1-PABD.** A–C, GST and GST-PABD beads were incubated with liposomes containing 5% NBD-PE, 85% of DOPC, and 10% of the indicated PA. PA species presenting the highest binding to the PABDs are encircled, and significant differences in binding are indicated ($n = 3$ independent experiments, $*$, $p > 0.05$; $**$, $p > 0.01$; and $***$, $p > 0.001$). Data are presented as means \pm S.D. (of triplicate measurements from a representative experiment, $n = 3$). D, effect of increasing fatty acid chain lengths on saturated PA on binding to GST-PABD beads. Background fluorescence measured when liposomes were incubated with GST beads alone was subtracted. Data are presented as means \pm S.D. (of triplicate measurements from a representative experiment, $n = 3$). Significant differences from PA(8:0/8:0)-containing liposomes are indicated ($n = 3$ independent experiments; $*$, $p > 0.05$, and $**$, $p > 0.01$).

Effect of Membrane Topology and Environment on the PA Binding Capacity of the PABDs of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1—Differences in membrane curvature may also modulate the availability of PA molecules for interacting with target proteins, and this can be reproduced by varying the size of liposomes. Among the different PA species, we decided to probe the effect of membrane curvature using liposomes containing mono-unsaturated PA (PA 18:0/18:1, Fig. 4A) or bis/polyunsaturated PA (PA 18:2/18:2 or PA 16:0/22:6, data not shown). As illustrated in Fig. 4A, increasing the liposome radius from 50 nm to 1 μ m slightly reduced binding to the three PA probes. However, the effect of membrane curvature was not significantly different among liposomes composed of different PA species (data not shown). This observation is in contrast to the high sensitivity to curvature of the amphipathic lipid packing sensor (ALPS) motif of a Golgi tether that displays almost no charge but a well developed hydrophobic face (26).

As cholesterol has a critical influence on lipid packing, the effect of increasing the cholesterol concentration in PA-containing liposomes was investigated. Cholesterol was found to increase the binding of liposomes to Spo20p-PABD and to a lesser extent to PDE4A1-PABD, but it reduced the binding to

Opi1p-PABD (Fig. 4B). Similar results were obtained with DOPC and POPC liposomes (data not shown). Thus, the three PA probes are sensitive to the presence of cholesterol in the PA lipid environment.

In liposome reconstitution assays, the effect of electrostatics can be very pronounced. When binding occurs through a cryptic polybasic region, which like Velcro binds firmly above a threshold of negative charges, additional charges provided by other lipids may contribute to the binding. To probe the effect of the net charge on the binding capacity of the PABDs, increasing amounts of phosphatidylserine (PS) were added to the liposomes. As the charge was increased, PA-containing liposome binding to Spo20p-PABD and PDE4A1-PABD was gradually enhanced, but there was no modification in the binding to Opi1p-PABD (Fig. 4C). Finally, we examined the effect of calcium, which can electrostatically interact with the two dissociable protons of the PA phosphate moiety and thereby modulate the number of charges available for interaction (27, 28). In the presence of 20 μ M calcium, PA-liposome binding to Spo20p-PABD and PDE4A1-PABD was increased, whereas binding to Opi1p-PABD appeared insensitive to this calcium concentration (Fig. 4D), again arguing for calcium sensitivity differences among the PA sensors.

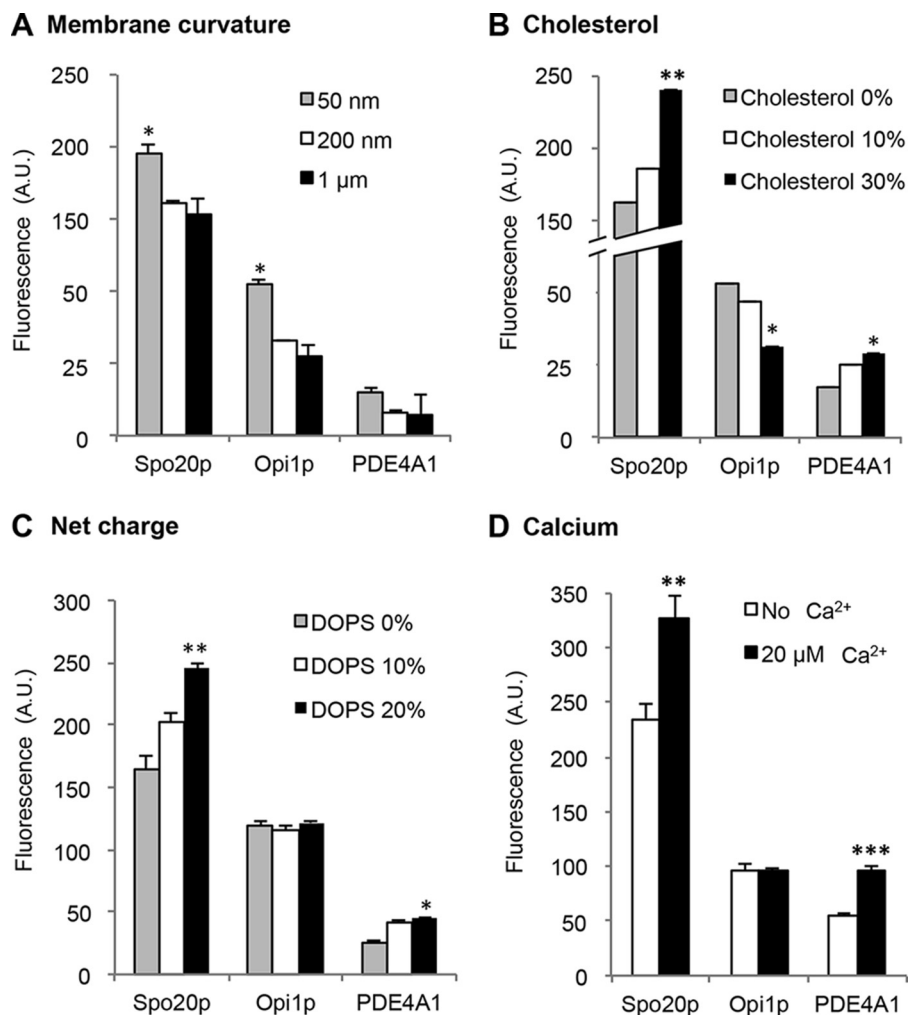


FIGURE 4. Effect of membrane curvature, cholesterol, surface charge, and calcium on PA binding of Spo20p-PABD, Opi1p-PABD, and PDE4A1-PABD. A, GST-PABD beads were incubated with liposomes of different sizes (50 and 200 nm and 1 μm) containing 5% of PE-NBD, 85% of DOPC, and 10% of PA (18:0/18:1). Results are presented as means ± S.D. Significant differences to 200 nm liposomes are indicated ($n = 3$ independent experiments; *, $p > 0.05$). B, GST and GST-PABD beads were incubated with liposomes containing 5% of PE-NBD, 85% of DOPC, and 10% of PA (18:0/18:1). The % cholesterol represents the % that replaces DOPC in liposomes. Data are presented as means ± S.D. Significant differences were observed between 0 and 30% cholesterol for each condition as indicated ($n = 3$ independent experiments; *, $p > 0.05$; **, $p > 0.01$). C, GST-PABD beads were incubated with liposomes containing 5% of PE-NBD, 85% of DOPC, and 10% of PA (18:1/18:1) with the indicated % of PS (at the expense of DOPC). Liposomes with PS were compared with liposomes containing just DOPC for each PABD. Data are presented as means ± S.D. (of triplicate measurements from a representative experiment, $n = 3$). Significant differences are indicated ($n = 3$ independent experiments; *, $p > 0.05$, and **, $p > 0.01$). D, GST-PABD beads were incubated with liposomes containing 5% PE-NBD, 85% of DOPC, and 10% of PA in the presence (dark columns) or the absence (open columns) of 20 μM calcium. Data are presented as means ± S.D. (of triplicate measurements from a representative experiment, $n = 3$). For each PABD, significant differences in binding in the presence and absence of calcium are indicated ($n = 3$ independent experiments; **, $p > 0.01$, and ***, $p > 0.001$).

PABDs of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 Display Specific Intracellular Localizations in Macrophages—To promote particle engulfment, phagocytic cells remodel their plasma membrane and increase their surface area by incorporating intracellular vesicles, and this process appears to require PLD-generated PA (18, 19). To investigate the intracellular sites of PA synthesis in the course of phagocytosis, we expressed the PABD probes fused to GFP (GFP-PABDs) in RAW 264.7 macrophages. In non-stimulated cells, GFP-Spo20p-PABD was largely concentrated in the nucleus, although to some extent it also underlined the plasma membrane, as indicated by partial co-localization with the isolectin IB4 (Fig. 5A), in agreement with the peripheral distribution observed previously (15). Like GFP-Spo20p-PABD, GFP-Opi1p-PABD was present in the nucleus, but also in the cytoplasm where it appeared associated with faint retic-

ular structures, which partially co-localized with the ER marker calnexin (Fig. 5A), arguing that Opi1p-PABD may bind PA in ER membranes of macrophages. In contrast, the distribution of GFP-PDE4A1-PABD was markedly different as it accumulated mostly in the perinuclear region and co-localized with giantin, a membrane protein of the Golgi apparatus (Fig. 5A). Of note, the three GFP-PABD proteins, in which PA binding was abolished by point mutations, were essentially distributed throughout the cytoplasm or the nucleus and apparently were no longer membrane-bound (Fig. 5B). Thus, when expressed in macrophages, the three PA probes are also able to distinguish between PA pools present in different subcellular compartments, suggesting that they most likely sense either different PA species and/or PAs in specific lipid or charge environments.

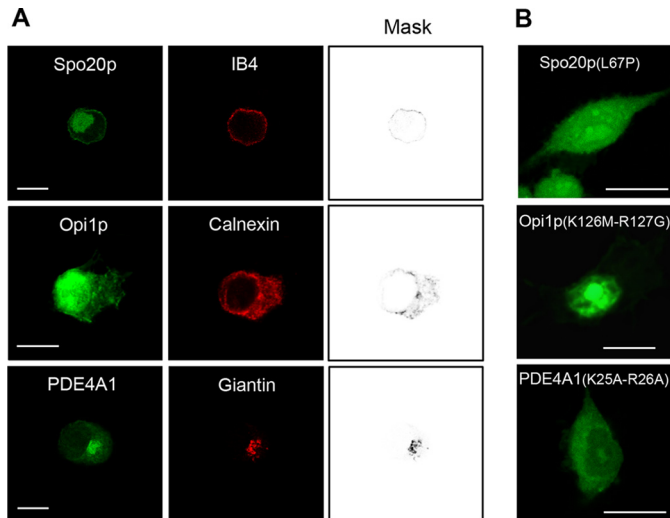


FIGURE 5. Subcellular distribution of GFP-Spo20p-PABD, GFP-Opi1p-PABD, and GFP-PDE4A1-PABD in RAW 264.7 macrophages. *A*, confocal images of macrophages expressing different GFP-PABDs and stained with the plasma membrane marker IB4, the ER marker calnexin, or the Golgi marker giantin, respectively. The images shown are representative of at least 100 cells obtained with at least five different cell preparations. *Bar*, 10 μ m. Mask images highlight co-localization with the respective markers. *B*, macrophages expressing mutated GFP-PABDs. Similar observations were obtained with at least three different cell preparations. *Bar*, 10 μ m.

To examine the distribution of the GFP-PABDs during phagocytosis, we used the well characterized frustrated phagocytosis assay. Particle phagocytosis can be mimicked in macrophages plated on BSA-anti-BSA IgG-coated dishes and stimulated by a temperature shift from 4 to 37 $^{\circ}$ C, as shown in the images obtained by scanning electron microscopy (Fig. 6*A*). GFP-PABD distribution in macrophages plated on BSA-anti-BSA IgG-coated dishes at 4 $^{\circ}$ C was similar to that of macrophages grown on glass coverslips (data not shown). In macrophages expressing GFP-Spo20p-PABD, frustrated phagocytosis resulted in a massive recruitment of the probe at the plasma membrane, especially on vesicular podosome-like structures, which were evident in basal sections of cells, concomitant with a net reduction of the nuclear localization of the probe (Fig. 6, *B* and *C*). These results are in line with our previous observation using another PA probe GFP-Raf-PABD, which is also recruited to phagosomes during the phagocytosis of IgG-coated particles by RAW 264.7 macrophages (19). Interestingly, in phagocytosing macrophages, GFP-Opi1p-PABD was also observed at the cell periphery and reduced in the ER (Fig. 6, *B*, *arrows*, and *C*). In contrast, frustrated phagocytosis did not alter the localization of GFP-PDE4A1-PABD on giantin-positive perinuclear structures (Fig. 6*B*). Altogether, these data reveal major changes in PA levels and/or composition in the plasma membrane but also in the ER of macrophages undergoing phagocytosis.

Lipidomic Analysis Confirms Subcellular Changes in PA Levels Detected by the PABD Probes during Frustrated Phagocytosis—To confirm the data obtained using the PA sensors, cellular and subcellular PA levels in macrophages before and after induction of frustrated phagocytosis were analyzed by mass spectrometry. Fractions enriched in cellular organelles from non-stimulated and stimulated macrophages were ob-

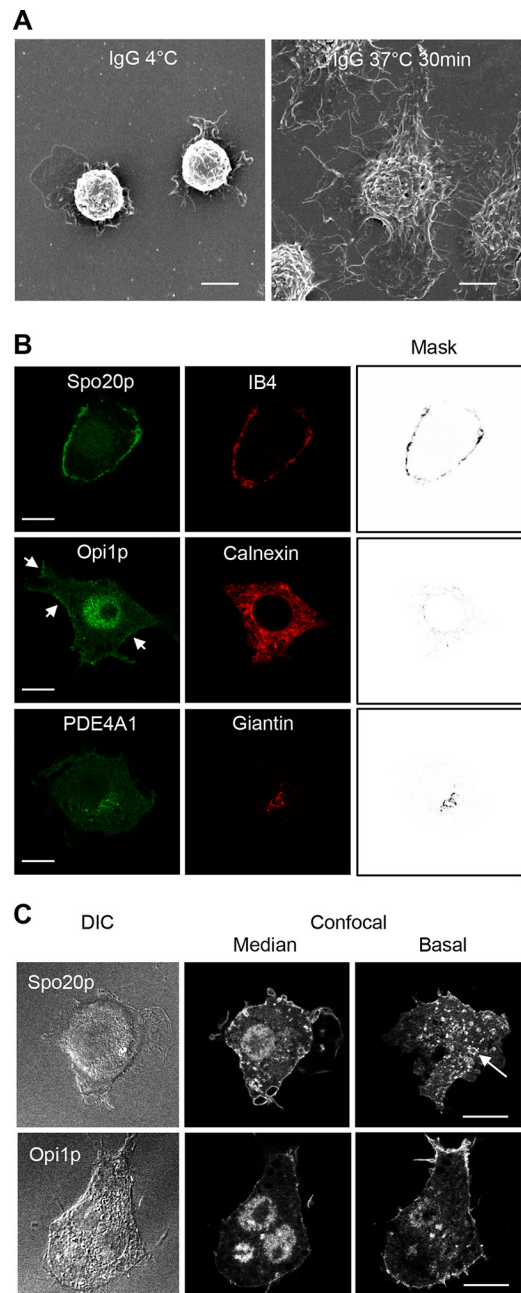


FIGURE 6. Subcellular distribution of GFP Spo20p-PABD, GFP-Opi1p-PABD, and GFP-PDE4A1-PABD during frustrated phagocytosis in RAW 264.7 macrophages. *A*, scanning electron microscopy images of macrophages spreading after inducing frustrated phagocytosis by shifting from 4 to 37 $^{\circ}$ C for 30 min. *B*, confocal images of macrophages expressing the different GFP-PABDs, fixed after 30 min of frustrated phagocytosis, and stained for subcellular markers as described in Fig. 5*A*. Note that GFP-Spo20p-PABD and GFP-Opi1p-PABD (*arrows*) have been recruited to the plasma membrane, but GFP-PDE4A1-PABD localization is unchanged and remains concentrated in the Golgi apparatus. *C*, differential interference contrast (DIC) image and corresponding confocal images (median and basal sections) of macrophage expressing GFP-Spo20p-PABD and GFP-Opi1p-PABD after 30 min of frustrated phagocytosis. GFP-Spo20p-PABD-labeled podosome-like structures at the base of the cell (*arrow*). The images shown are representative of at least 100 cells obtained with three to five different cell preparations. *Bar*, 10 μ m.

tained by differential centrifugation of cell lysates (Fig. 7*A*). In cell lysates, the total PA corresponded to \sim 2000 pmol/mg protein, which is in line with a previous lipidomic profiling of this cell line (29). After 30 min of phagocytosis, the total cellular

Characterization of PA Sensors

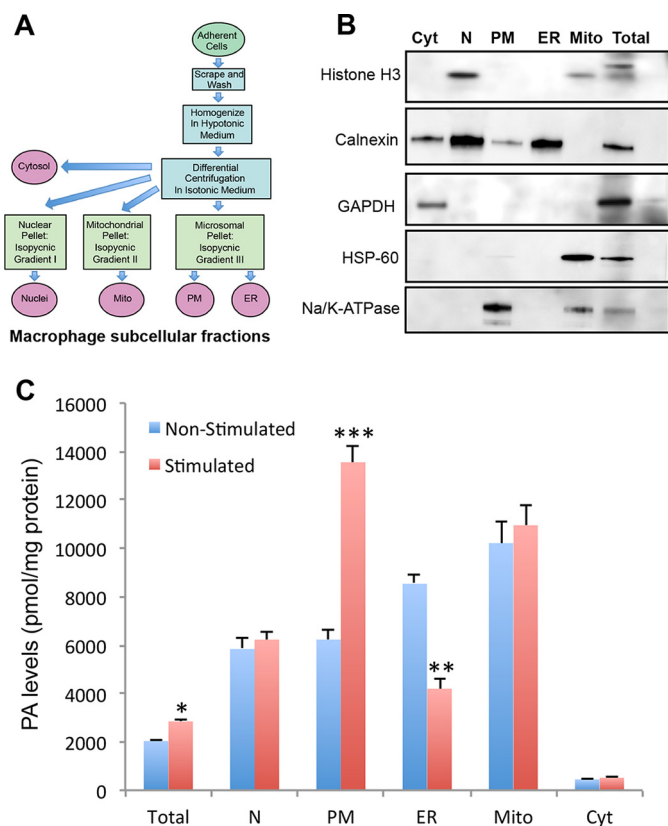


FIGURE 7. PA levels in subcellular membrane fractions from RAW 264.7 macrophages undergoing frustrated phagocytosis. *A*, schematic representation of the different steps from subcellular fractionation to lipidomic analysis. *B*, verification of subcellular fractionation by immunoblotting 30 μ g of protein of different fractions (cytosol (Cyt), nucleus (N), plasma membrane (PM), endoplasmic reticulum (ER), mitochondria (Mito) and crude extract (Total)). The following markers were used: nuclear marker histone H3; ER marker calnexin; cytosol marker GAPDH; mitochondrial marker HSP-60; and the plasma membrane marker Na⁺/K⁺-ATPase. *C*, PA levels were measured by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200 μ g of protein) from each fraction either from cells kept at 4 °C (non-stimulated) or shifted to 37 °C for 30 min (stimulated). Results are presented as the means \pm S.E. ($n = 3$) obtained from independent experiments. Significant differences between non-stimulated and stimulated conditions for each fraction are indicated (*, $p > 0.05$; **, $p > 0.01$; and ***, $p > 0.001$).

level of PA increased by $39.6 \pm 4.3\%$ (Fig. 7C). Although no significant changes were observed in the cytosol, mitochondria, and nuclear fractions, strong differences in PA levels were detected in the ER and plasma membrane-containing fractions (Fig. 7C). PA levels doubled in the plasma membrane fraction and, inversely, decreased by 50% in the ER fraction. These data are in line with the changes in localization observed with the PA sensors, GFP-Opi1p-PABD and GFP-Spo20p-PABD. In macrophages, phagocytosis is accompanied by a strong increase in PA at the plasma membrane, in line with the presence of PLD at the cell periphery (18, 19), and a concomitant reduction in PA levels in the ER, an observation that may support the possible and up to now largely debated contribution of the ER to phagocytosis (15). A detailed MS analysis of the ER membrane fractions allowed us to detect significant levels of 44 different PA species (data not shown). Intriguingly, with the exception of four polyunsaturated ω -3 forms of PA, for which levels were moderately reduced after frustrated phagocytosis, the levels of each species was very similarly reduced by nearly 55% (data not shown).

PABD Probe Binding Does Not Depend on Proteins Present in Membrane Compartments—The binding of GST-Spo20p-PABD and GST-Opi1p-PABD to plasma or ER-enriched membrane fractions (see Fig. 7B for purity estimation) was estimated by measuring unsaturated fatty acid phospholipid levels associated with GST-PABDs linked to GSH-Sepharose beads. No significant lipid binding was found when plasma or ER-enriched membranes were incubated with control GST linked to GSH-Sepharose beads (Fig. 8A). GST-Spo20p-PABD preferentially bound to plasma membranes compared with ER membranes, whereas GST-Opi1p-PABD preferentially bound ER membranes (Fig. 8A). This finding is in line with the intracellular distribution of GFP-Spo20p-PABD and GFP-Opi1p-PABD observed in macrophages (Fig. 5). To probe whether the binding preferences of the PABD probes might involve interactions with membrane-associated proteins, plasma and ER membrane fractions were treated with either trypsin or proteinase K to hydrolyze associated proteins (Fig. 8, inset) and incubated with GST-Spo20p-PABD or GST-Opi1p-PABD. Both protease treatments did not significantly change the amount of membrane bound to the PA sensor beads (Fig. 8, B and C), indicating that membrane-associated proteins do not contribute to the binding capacity and selectivity of the PA sensors. In other words, the PABD probes most likely sense the PA species and their lipid environment within membranes.

Discussion

Relatively limited information is available to model the interaction between PA and PA-binding proteins. In the original study describing the ability of Spo20p to bind specifically PA, the PA-binding domain was predicted to form an amphipathic helix with both positively charged and hydrophobic amino acid residues contributing to PA binding (12). In agreement with these secondary structure predictions, we recently found that the PA-binding region of Spo20p is largely formed by an amphipathic helix spanning from Gly-56 to Leu-78 followed by a smaller helix on the C-terminal part (Phe-84 to Lys-89) (30). Using molecular dynamic simulation, the Spo20p PA-binding polypeptide was predicted to adopt an interfacial orientation with most of the hydrophobic residues embedded in the membrane, whereas positively charged residues coordinate several PA headgroups (30). Bioinformatics predict that the three PA sensors tested here adopt amphipathic helix conformations with four to six charged residues sequestered on one side of the helix, whereas the other side of the helix is enriched (five to seven) in hydrophobic residues (Fig. 9A). Most likely, PA binding by these short polypeptides does not involve a core-structured motif, but hydrophobic residue insertion into lipid bilayers and direct ionic interaction between basic residues and several molecules of PA. Spo20p-PABD is clearly the probe that binds the most efficiently to PA. This may reflect a structure that is more optimal for PA binding in Spo20p-PABD and could involve a higher density of hydrophobic and charged residues on each side of the α -helix (Fig. 9A). Spo20p-PABD also contains a unique histidine-rich polar face that may contribute to some of its specific characteristics for binding to PA in membranes. By changing the liposome amounts in the binding assay, we were able to calculate the concentration of liposomes

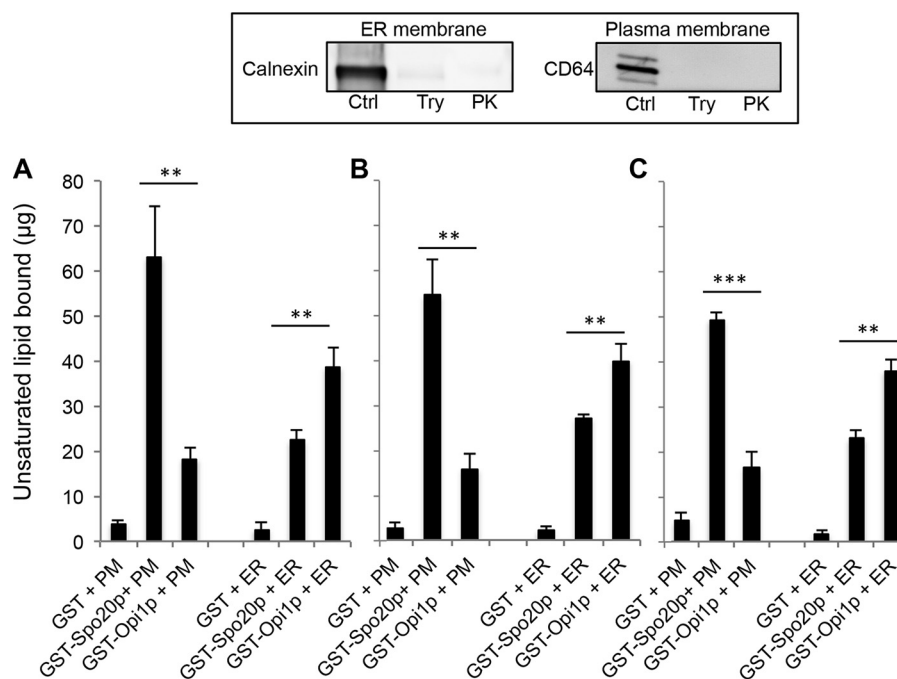


FIGURE 8. Binding of Spo20p-PABD and Opi1p-PABD to plasma and ER membranes obtained by subcellular fractionation. A, GST or GST-PABDs beads were incubated with plasma (PM) or ER membranes (containing ~400 μg of unsaturated lipids) for 30 min, and the amount of lipid bound to the beads was estimated using a colorimetric quantification kit for unsaturated lipids. B and C, similar experiments were performed with plasma (PM) and ER membranes previously incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h with trypsin or proteinase K, respectively. Proteases were heat-inactivated for 1 h at 75 $^{\circ}\text{C}$ before incubating samples with GST-PABD bound to GSH beads. Results are presented as the means \pm S.E. ($n = 3$) obtained from independent experiments. Significant differences for lipid binding between GST-Spo20p-PABD and GST-Opi1p-PABD are indicated (**, $p > 0.01$, and ***, $p > 0.001$). In each condition a background signal measured from GST and GST-PABDs beads alone was subtracted. *Inset* reveals the absence of the plasma and ER membrane markers (CD64 and calnexin, respectively) as revealed by immunoblotting plasma and ER membranes after trypsin (Try) or proteinase K (PK) treatment as compared with control membranes (50 μg) incubated without protease (Ctrl).

required for half-maximal binding. From these values, the apparent K_d value for PA(18:0–18:1) binding by GST-Spo20p-PABD, GST-PDE4A1-PABD, and GST-Opi1p-PABD was 2.2, 6.8, and 4.5 μM , respectively. The low micromolar range for each PABD is reflecting as expected a low affinity interaction. These apparent K_d values are, however, rather crude estimations of the affinity because both the liposomes and the PABD should be considered as soft matter. Indeed, it is likely that the PABDs adopt an unstructured conformation in solution and progressively organize in α -helical structures as they associate with liposome membranes. Furthermore, it should be noted that it is likely that the different PABDs bind to more than one PA molecule.

The present *in vitro* observations indicate that the three PA sensors tested here require a specific membrane environment for optimal PA binding (summarized in Fig. 9B). Our findings are in agreement with the observations showing that different PA-binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties (31). Although it is impossible to completely rule out that additional factors, such as trans-membrane proteins, contribute to the distinct subcellular distribution found in macrophages, the *in vitro* data suggest that the probes are able to distinguish not only the level but also the species of PA in a particular lipid environment. In agreement, the binding preference of GST-Spo20p-PABD and GST-Opi1p-PABD toward either plasma or ER membranes remains unchanged even after effective proteolysis (Fig. 8). Importantly, preferential binding for a particular

PA was observed only when PAs were included in a lipid environment. When the GST-PABD probes bound to GSH-Sepharose beads were incubated with a mixture of egg or soybean PA of known composition, mass spectrometry analysis showed that the proportion of each of the PA species bound to the sensors was strictly similar to the original PA mixtures (data not shown). This clearly indicates that the PABD-PA interaction involves parameters occurring in a membrane context. Thus, the three probes studied here present their own spectrum of binding preferences to different PA species based on fatty acid chain length and saturation. Although the subcellular distribution of PA sensors might rely on additional parameters such as the luminal pH (32), it is noteworthy that the change of subcellular distribution observed here during frustrated phagocytosis was correlated with a change in PA level in the corresponding membrane compartments. Furthermore, the fact that point mutations that reduce charged clusters (Opi1p-PABD and PDE4A1-PABD) or the α -helical conformation (Spo20p-PABD) strongly reduce binding of PA-containing liposomes and induce membrane to cytosol relocation supports the notion that the intracellular distribution of these probes is highly sensitive to PA levels in membranes. These PABD probes might therefore represent useful tools to detect the PA level and composition in distinct subcellular membranes and the possible variations during cell activation.

Binding of Spo20p-PABD to PA is favored by high charges, cholesterol and calcium, and at a lesser extent by the length and saturation of the fatty acyl chains and packing defects (Fig. 9B).

Characterization of PA Sensors

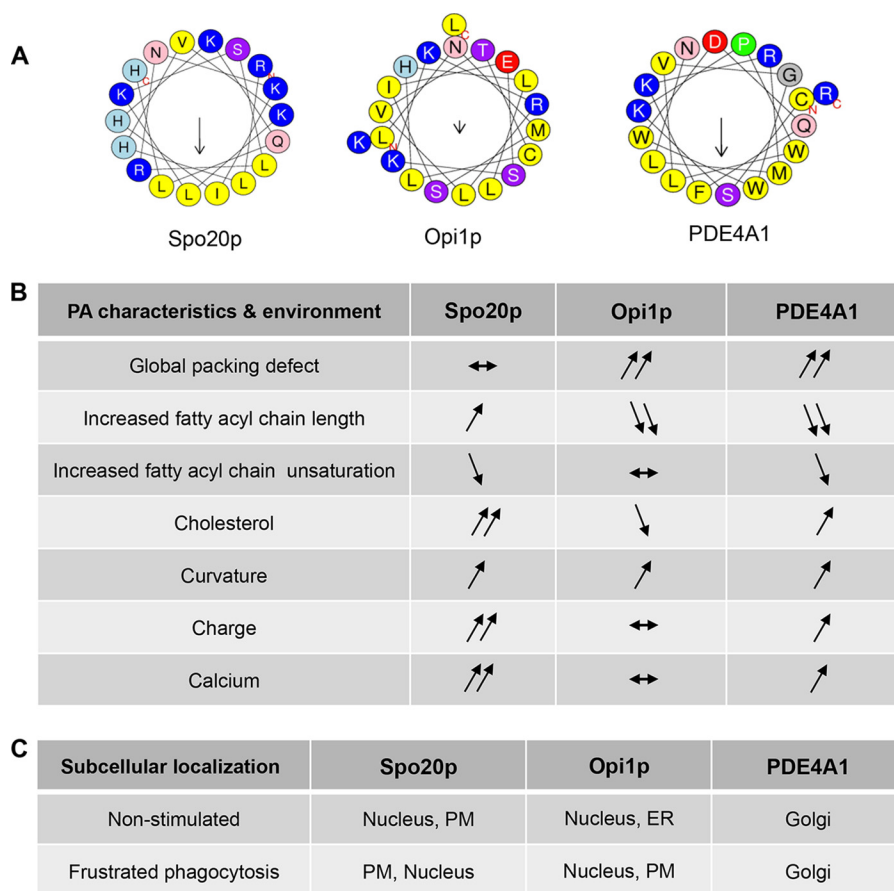


FIGURE 9. PA binding profile of Spo20p-PABD, Opi1p-PABD, and PDE4A1-PABD and subcellular localization in macrophages. *A*, amphipathic α -helix projections of the core 18–20 amino acids of the PABD of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 obtained with Heliquest software. Arrows indicate hydrophobic moments. *B*, table summarizing the data from Figs. 2 to 4. The arrows reveal absence, positive, or negative effects of the indicated liposome parameter on binding of the GST-PABDs to PA-containing liposomes. *C*, comparison of the subcellular distribution of the GFP-PABD of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 in non-stimulated RAW 264.7 macrophages and during frustrated phagocytosis. The preferential subcellular compartment of each probe is noted first.

These characteristics are typical of endosomal and plasma membranes (25). In fact Spo20p is the yeast homologue of SNAP-25 necessary for spore formation. As shown here, when expressed in macrophages (summarized in Fig. 9C), GFP-Spo20p-PABD is recruited to the plasma membrane during phagocytosis similar to what is observed in stimulated PC12 cells undergoing neurosecretion (6, 15). Altogether, our findings suggest that GFP-Spo20p-PABD might represent a PA sensor particularly suitable to detect PA modifications in the plasma membrane and derived organelles. It is noteworthy to mention that a probe containing two Spo20p-PABDs fused to GFP or GST through two coiled-coil motifs displayed similar characteristics regarding binding to PA, although it also bound avidly to PI(4,5)P₂ (33). Increased binding to PI(4,5)P₂ of this double-Spo20p coiled-coil, potentially a consequence of the apposition of tandem Spo20p motifs, reduces the cellular interest of this tool as a specific PA sensor. This construct has, in consequence, not been used as widely as GFP-Spo20p-PABD for monitoring PA in cells (2, 6, 15).

The biophysical membrane parameters for optimal binding of Opi1p-PABD are high packing defects, short and unsaturated PA, low cholesterol levels, and little charge, which all are hallmarks of the ER membrane (25), where this sensor accumulates in macrophages (summarized in Fig. 9C). Of note, this is

only in partial agreement with the findings of Hofbauer *et al.* (34), where the full-length Opi1p protein was found to preferentially bind to short but saturated PA. These differences may result from additional domains/interactions occurring in the full-length Opi1p but also from the limited number of PA species used in their liposome flotation assay (34), with the latter being clearly less quantitative than the fluorimetric assay presented here. In agreement with our findings, the lipidomic analysis revealed that saturated PA species are in extremely limited amounts in the ER fraction purified from cultured macrophages (data not shown), making it unlikely that these PA species played a role in recruiting GFP-Opi1p-PABD to the ER in macrophages. In yeast, Opi1p is a transcriptional repressor, which is normally localized on the ER via its interaction with PA. Under conditions where the biosynthetic PA pool is depleted, Opi1p-PABD translocates to the nucleus where it represses genes involved in inositol synthesis (13). Thus, the GFP-Opi1p-PABD sensor may be ideally suited to follow PA dynamics in the ER of most cellular models.

The PDE4A1-PABD appeared somehow intermediate in these requirements and was found to associate with the Golgi, which makes the transition between the lipid-packing defects and electrostatic territories (3). In agreement, the PABD of PDE4A1 has previously been shown to consist of two α -helices

linked by a hinge; the two tryptophan residues of the second helix are important for lipid insertion, whereas the first helix is important for a calcium-sensitive association with the Golgi (35).

Finally, it is also worth mentioning that the PA-binding signals of Spo20p and Opi1p overlap with nuclear targeting signals, suggesting some functional coupling between nuclear traffic and PA recognition. On the one hand, specific protein-PA interactions may occur in the nucleus, but on the other hand regulating extra-nuclear PA levels may represent a physiological control mechanism for the localization of these proteins, as has been suggested for Opi1p (13). Moreover, PA binding near the PX domain of p47^{Phox} has been reported to regulate its affinity for phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (36), indicating that PA binding can also indirectly affect membrane affinity by modulating additional membrane interaction domains. Thus, in some circumstances membrane anchorage may require more than one binding site or lipid modification to facilitate cytosolic translocation to membranes in living cells. The precise characterization of other PABDs described to date, will undoubtedly prove helpful in understanding the molecular mechanisms of protein-PA interactions and generate novel PA sensors that are critically needed to follow PA dynamics in the cytosolic leaflets of cellular membranes in real time and ultimately gain insight into the complex structural and signaling functions of the simplest glycerophospholipid.

The biosynthesis and consumption of PA are regulated in cells by several different enzymatic routes (2). Biosynthetic pools of PA are mainly formed in the ER by the assembly of glycerol 3-phosphate and fatty acyl-CoA and are an essential intermediate for the formation of other phospholipids or phosphoinositides. Signaling and more directly functional pools of PA are formed from PC via the action of PLD and by the phosphorylation of DAG following, for example, hydrolysis of PI(4,5)P₂ on distinct subcellular membrane compartments. The present finding that PA levels are dramatically modified in the plasma membrane and in the ER during phagocytosis, as revealed by mass spectrometry analysis and the use of the GFP-PABD sensors, argues that signaling PA might be produced in both the plasma membrane and ER. It is worth mentioning that fluctuations in PA levels in both of these compartments have been observed following lipopolysaccharide activation of macrophages, although in this case the PA level decreased in the plasma membrane fraction and increased in the ER (29). During frustrated phagocytosis, the marked increase in PA levels in the plasma membrane fraction and the recruitment of the Spo20p-PABD and Opi1p-PABD probes at the plasma membrane is in line with previous observations showing that PA synthesis by PLD1 and PLD2 positively contributes to FcγR-mediated phagocytosis (21–24). In this case, the exaggerated phagocytic response provoked in the frustrated phagocytosis model probably requires a more extensive remodeling of the plasma membrane and a greater contribution from the intracellular membrane sources. This may explain why nearly half of PA has disappeared from the ER during frustrated phagocytosis. One possible explanation for this finding is that PA has been converted to other signaling lipids in the ER as a consequence of phospholipase A or PA-phosphatase activity. Alternatively,

there may have been a direct transfer of PA to the plasma membrane at ER-plasma membrane contact sites (37). In line with this hypothesis, we found that the levels of most of the 44 different species detected in our MS analysis decreased proportionally after frustrated phagocytosis (data not shown). These data could suggest an *en bloc* transfer of PA from the ER to the plasma membrane during frustrated phagocytosis. Although appealing, this latter possibility needs to be directly investigated, and the molecular mechanisms of PA transfer remain to be identified. However, in support of this possibility, extended synaptotagmins, which are ER resident integral membrane proteins, have recently been reported to serve as calcium-regulated tethers between the ER and the plasma membrane, thereby providing molecular support for lipid transfer between the ER and the plasma membrane in receptor-stimulated cells (38). In macrophages, the contribution of the ER to phagocytosis has been largely debated and remains controversial (18, 19). Yet, ER proteins appeared enriched in phagosomes (19), and additional work has suggested that ER contributions to phagocytosis occurs preferentially upon ingestion of large particles that require important membrane addition to the plasma membrane (39). Thus, these results support the idea that the ER might contribute to the increased PA levels at the plasma membrane during phagocytosis.

Materials and Methods

Antibodies—Anti-histone H3, anti-giantin (Ab24586), anti-Na⁺/K⁺-ATPase (Ab58475), anti-HSP-60 (Ab46798), and anti-calnexin (Ab22595) were purchased from Abcam; anti-CD64 (MAB2074) was from R&D Systems; anti-GST (G1160) was from Sigma, and anti-GAPDH (2118S) from Ozyme.

Expression of Recombinant GST-PABD Proteins—Fragments containing amino acids 50–101 from Spo20p (GenBankTM DAA09915.1) (12), 102–191 from Opi1p (GenBankTM M57383.1) (13), and 1–40 from PDE4A1 (GenBankTM M26715) (14) were used as PABD. The Spo20p-PABD was amplified by PCR from the pEGFP-C1-PABD-Spo20p construct (6) using the forward primer 5'-CGGGATCCCTCGAGCGTCTAGAATGG-3' and reverse primer 5'-GCGAATTCTTAAGTCTTAGTGGCGTC-3', as described previously. The Opi1p-PABD was amplified by RT-PCR from yeast DNA (gift from Dr. S. Friant, Université de Strasbourg, France) using the forward primer 5'-AGTGGATCCGATGAGTTCTTACCAAC-3' and reverse primer 5'-AGTGAATCCGATGTCTCGTCCCTCGCC-3'. The PDE4A1-PABD corresponding to the N-terminal regulatory domain of a cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) was amplified by RT-PCR from rat cDNA as described (14), using the forward primer 5'-AGCGGATCCATGCCTCTGGTTGACTTC-3' and reverse primer 5'-AGCGAATTCTGACCTGCTCATTCCGAC-3'. The PABDs were inserted in-frame into pGEX4T1 as described previously (40). Point mutations were created to abolish PA binding on Spo20p-PABD(L67P), Opi1p-PABD(K126M/R127G), and PDEA41-PABD(K25A/R26A) with a QuikChange site-directed mutagenesis kit from Stratagene (41). Mutations and sequences of the clones were verified by automated sequencing. Large scale production of chimeric GST-PABD proteins has been previously described (42). Briefly, expression was induced at 37 °C; fusion proteins were

Characterization of PA Sensors

purified on glutathione (GSH)-Sepharose (43) and purity was estimated to be >95% by Coomassie Blue staining of SDS-polyacrylamide gels. The quantity of purified protein was determined from this dye binding assay using bovine serum albumin as a standard (44). Protein aliquots were stored at -80°C .

Lipid Overlay Assay—Following the protocol indicated by Molecular Probes, nitrocellulose membrane strips containing various phospholipids were saturated with blocking solution (phosphate-buffered saline containing 3% bovine serum albumin and 0.1% Tween 20 (PBS/BSA/Tween)) for 4 h at 4°C . Then the strips were incubated for 2 h at 4°C with GST-PABD proteins (diluted to $0.01\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS/BSA/Tween). GST alone was used as a control. Subsequently, the strips were analyzed by Western blotting using an anti-GST antibody (Molecular Probes) and revealed by chemiluminescence. Images were acquired with a Chemismart 5000 (Vilber Lourmat) and quantified using ImageJ software.

Liposome Flotation and Binding Assays—Liposome preparation was performed as described previously (45). Lipids solubilized in chloroform were purchased from Avanti Polar Lipids. Liposome mixtures were prepared in mass ratios composed of 85% PC, 5% PE-NBD, and 10% PA, PC, PE, PS, or PI(4,5)P₂ or with other molar ratios as indicated. Lipids were dried in a stream of nitrogen gas and kept under vacuum for at least 2 h. Dried lipids were then suspended at a concentration of $1.65\ \text{mg}/\text{ml}$ in liposome-binding buffer (LBB: 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) by three freeze and thaw cycles and were extruded using a Mini-Extruder (Avanti) through polycarbonate track-etched membrane filters to produce liposomes usually 200 nm in diameter, unless otherwise indicated. The size distribution of liposomes was estimated by dynamic light scattering using a Zetasizer NanoS from Malvern Instruments equipped with a 4-milliwatt laser. Samples were diluted 1:100 in LBB and analyzed at 20°C using 10 runs, each composed of 14 measurements.

To determine the association of the GST-PABD constructs with these liposomes, a liposome flotation assay was adapted from the protocol described by Bigay *et al.* (46). Briefly, $5\ \mu\text{g}$ of each probe was incubated with $150\ \mu\text{l}$ of NBD-labeled liposomes ($1\ \text{mg}/\text{ml}$) or LBB at room temperature for 15 min. This suspension was mixed with $100\ \mu\text{l}$ of LBB containing ice-cold 75% sucrose, resulting in a 30% sucrose layer, which was overlaid with $200\ \mu\text{l}$ of 25% sucrose solution prepared in ice-cold LBB and $150\ \mu\text{l}$ of ice-cold LBB. The step gradients were centrifuged at $200,000 \times g$ for 1 h at 4°C in a Beckman swinging rotor (SW-32 Ti). The top $150\text{-}\mu\text{l}$, middle $200\text{-}\mu\text{l}$, and bottom $250\text{-}\mu\text{l}$ layers were manually collected from the top and analyzed for fluorescence at excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively, with a Mithras (Berthold) fluorimeter, to quantify the percentage of liposomes present in each fraction. Equal volumes of fractions were run on SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-GST antibody as described previously (47).

A second approach was carried out to quantify liposome binding to GST-PABDs linked to GSH-Sepharose beads. GST and GST-PABDs ($330\ \text{pmol}$) bound to GSH beads were washed once with 1 ml of LBB medium before incubating for 20 min in the dark at room temperature and under agitation with liposomes

containing a 10-fold molar excess of PA relative to the quantity of GST proteins in a final volume of $200\ \mu\text{l}$ of LBB. Beads were washed three times with 1 ml of ice-cold LBB and collected by centrifugation at 3000 rpm for 5 min. Liposome binding to the PABDs was estimated by measuring the fluorescence at 535 nm with a Mithras (Berthold) fluorimeter. Triplicate measurements were performed for each condition. Fluorescence measured with GST linked to GSH-Sepharose beads alone was between 3 and 4 A.U. and was subtracted from sample measurements.

Membrane Binding Assay and Saturated Lipid Quantification—GST and GST-PABDs ($330\ \text{pmol}$) bound to GSH beads were washed once with 1 ml of LBB medium before being incubated for 30 min at room temperature and under agitation in LBB with plasma and ER membranes (containing $\sim 400\ \mu\text{g}$ of unsaturated lipids), purified as described below. Beads were washed once with 1 ml of ice-cold LBB and collected by centrifugation at 5000 rpm for 1 min. Lipid binding to the PABDs was estimated by measuring the amount of unsaturated lipids using a colorimetric lipid quantification kit (Clinisciences, France) as described by the manufacturer. Briefly standards and samples were incubated with $150\ \mu\text{l}$ of sulfuric acid and heated at 90°C for 10 min, before incubation with vanillin at 37°C for 15 min. The absorbance at 540 nm was measured with a Mithras (Berthold) fluorimeter. Samples of membrane fractions containing $\sim 200\ \mu\text{g}$ of protein were incubated without or with trypsin at $0.1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ or proteinase K at $0.2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in $20\ \mu\text{l}$ for 2 h at 37°C . Samples were incubated for 1 h at 75°C for protease heat inactivation before incubating samples with GST-PABDs bound to GSH beads.

GFP-PABD Probes—The binding domain was described previously (6). GFP-Opi1p-PABD and GFP-PDE4A1-PABD were generated by inserting the PABDs in BglII- and EcoRI-digested pEGFP-C1. Mouse macrophage RAW 264.7 cells were maintained in RPMI-GlutaMAX medium (Gibco and Thermo Fisher Scientific), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, $50\ \mu\text{M}$ β -mercaptoethanol, 100 units/ml penicillin, and $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin at 37°C under 5% CO₂. For frustrated phagocytosis studies, cells were plated on Ucell dishes (Nunc, Thermo Fisher Scientific) to facilitate the preparation of cell suspensions and grown in macrophage serum-free medium (Thermo Fisher Scientific). RAW 264.7 cells at 50% confluence on glass coverslips or in 6-well Ucell plates were transfected with GFP-PABD plasmids using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific).

Frustrated Phagocytosis—Frustrated phagocytosis reflected by cell spreading on immobilized immune complexes was carried out either on Petri dishes (Falcon, 10 cm) for cellular fractionation or on glass coverslips for imaging. Surfaces were pre-coated with BSA (3%) and either rabbit anti-BSA IgG ($0.04\ \text{mg}/\text{ml}$, Invitrogen A11133, Thermo Fisher Scientific) or sheep anti-BSA ($0.04\ \text{mg}/\text{ml}$, Euromedex GTX77113) adapted from the protocol of Bainton *et al.* (20). Suspensions of RAW 264.7 cells ($2 \times 10^7/10\text{-cm}$ dish for fractionation; $1\text{--}2 \times 10^5/12\text{-mm}$ coverslip, or $1\text{--}2 \times 10^4/\text{glass-bottom microwells}$ (MatTek) for microscopy) in cold serum-free medium were then allowed to attach to pre-coated surfaces at 4°C for 1 h. Cell spreading was

initiated by warming to 37 °C for 30 min for fractionation and 10, 20, or 30 min for microscopy. As controls, macrophages were either plated on surfaces pre-coated with immune complexes or with BSA alone and maintained at 4 °C.

Immunolabeling and Confocal Microscopy—After washing in cold medium, adherent macrophages transfected with GFP-PABD constructs were fixed with 4% paraformaldehyde in serum-free medium for 10 min at room temperature. Then, transfected cells were either directly labeled with Hoechst and Isolectin B4 (IB4-A647 Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) or permeabilized in PBS containing 4% paraformaldehyde and 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature. Calnexin (1:200 dilution) and giantin (1:500 dilution) antibodies were used as markers for the ER and the Golgi apparatus, respectively, and revealed with a goat anti-rabbit IgG-Alexa 647 (1:1000 dilution, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific). The cellular distributions of the PA probes and markers were examined with a Leica SP5 II confocal microscope equipped with an oil immersion $\times 63$ objective (Plan Aplanochromat n.a. = 1.4). Digital images were acquired in the equatorial and basal planes. Mask images were generated as described previously (48).

Scanning Electron Microscopy—To verify frustrated phagocytosis, as measured by cell spreading on coated coverslips, macrophages were prepared for scanning electron microscopy. Phagocytosis was stopped by placing samples on ice and rinsing with cold macrophage serum-free medium. Cells were then fixed with 2% glutaraldehyde in serum-free medium for 30 min and a further 30 min with 2% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline, before being dehydrated and embedded in Durcupan. After decapping samples with propylene oxide, they were carbon-coated and examined with a Hitachi S800 scanning electron microscope.

Subcellular Fractionation— 1.5×10^8 RAW 264.7 were harvested as described (29) by scraping in 40 ml of PBS, pelleted at $200 \times g$ for 7 min, resuspended in 40 ml of isolation medium (250 mM sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EGTA), and pelleted again to remove salts (see Fig. 7A). For effective homogenization, cells were subjected to mild osmotic shock in 40 ml of slightly hypotonic medium (isolation medium containing 100 mM sucrose) and thereafter pelleted. The supernatant was set aside; the cell pellet was carefully transferred to a glass Dounce homogenizer; 10 ml of the supernatant was added, and the mixture was homogenized by 40 strokes with a tight-fitting pestle. The resulting slurry was then combined with the remaining supernatant. The homogenate was brought to an isotonic state by the addition of 3.5 ml of the hypertonic medium (isolation medium containing 1.78 M sucrose) and then supplemented with 2 mM $MgCl_2$ to preserve nuclei through subsequent steps. Differential centrifugation parameters were as follows: $200 \times g$ for 10 min to pellet nuclei/unbroken cells (“nuclear” pellet), $5000 \times g$ for 10 min to pellet mitochondria, and $100,000 \times g$ for 1 h to pellet microsomes and plasmalemma fragments. Post-nuclear and post-mitochondrial supernatants were additionally purified by centrifugation at 300 and $5000 \times g$ for 10 min, respectively, to remove residual nuclei and mitochondria. The crude nuclear and mitochondrial pellets were then washed and pelleted in Mg^{2+} -containing and

Mg^{2+} -free media, respectively. The supernatant from the $100,000 \times g$ spin was retained as the cytosolic fraction. The nuclear, mitochondrial, and microsomal pellets were subjected to centrifugation through OptiPrep step gradients in an SW-32 Ti rotor. Gradient media were prepared according to the manufacturer’s instructions using the isolation medium described above; for nuclear preparation, the medium was supplemented with 5 mM $MgCl_2$. To purify nuclei, the crude nuclear pellet was adjusted to 25% OptiPrep (final volume = 12 ml), and OptiPrep gradients were formed from the bottom up in three 12-ml tubes (4 ml in 10%, 4 ml nuclei in 25%, 2.5 ml in 30%, and 1.5 ml in 35% of OptiPrep) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min. Nuclei were recovered at the 30/35% OptiPrep interface. The mitochondrial and microsomal pellets were resuspended in isolation medium adjusted to 35% OptiPrep (final volume = 6 ml) and fractionated by flotation for 2 h at $50,000 \times g$ in three 12-ml tubes through a gradient that was formed with 2 ml of 10% OptiPrep, 4 ml of 17.5% OptiPrep, 4 ml of 25% OptiPrep, and 2 ml of the respective pellets resuspended in 35% OptiPrep. Mitochondria were collected at the 17.5/25% interface and plasmalemma and ER at the 10/17.5% and 17.5/25% interfaces, respectively. A third fraction, originating from the microsomal pellet, at the dense 25/35% interface, was termed heavy microsomes. All samples were frozen and stored at -80 °C. Purity of fractions was verified by immunoblots using specific markers for the different fractions as described previously (48).

Lipidomic Analysis—Total lipids from cell samples were extracted by the method of Bligh and Dyer (49). Extracts were mixed with chloroform/methanol (4:1), vortexed for 10 s, and left under agitation for 1 h at 4 °C. After a 5-min centrifugation at 13,000 rpm, the organic phase (150 μ l) was recovered and analyzed by mass spectrometry (UPLC/MS/MS) on an Acquity UPLC system (Waters) coupled to a Quattro Premier XE triple quadrupole MS system (Waters Micromass). The sample (3 μ l) was injected into an Acquity UPLC BEH HILIC Amide pre-column (2.1 \times 5 mm, 1.7- μ m particle size), coupled to a Waters Acquity UPLC BEH Amide column (2.1 \times 100 mm, 1.7- μ m particle size) and maintained at 28 °C. The column was eluted with a mixture of 99.5% acetonitrile, 0.5% ammonium hydroxide (A) and 80% acetonitrile, 19.5% water, 0.5% ammonium hydroxide (B). The flow rate was 0.4 ml·min⁻¹ using the following elution protocol: 93% A for 2 min, followed by the gradient, 93 to 60% A in 1 min, 60 to 50% A in 0.5 min, and 50 to 40% A in 1.5 min. The composition of the mobile phase was then returned to initial conditions as follows: 40–50% A in 2 min, 50–80% A in 2.5 min, 80–93% A in 0.5 min and maintained in 93% A for 2 min. UV spectra were recorded from 200 to 500 nm. The system was run by Mass-Lynx software (version 4.0). The ESI source was used in positive and negative mode with a capillary voltage of 3.4 kV; RF lens was at 0 V; resolution (LM1, HM1, LM2, and HM2) was 15; ion energy was 1 and 2:0.5. Source and desolvation temperatures were 135 and 400 °C. Flow rates of nitrogen for nebulizer and desolvation were 50 and 90 liters·h⁻¹. Pressure of the argon collision gas was $3.0 \cdot 10^{-3}$ mbar. Full scan, selected ion recording, and daughter scan mode were used for qualitative analyses. Quantitative PA analyses were made based on MS/MS multiple reaction monitoring (MRM) as described (50). Briefly, MRM transitions for

Characterization of PA Sensors

individual PAs were determined using PA standards (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). The PAs were identified as deprotonated parent ions [$M - H^-$]; cone energy was optimized for each PA and set to 44 V. The predominant daughter fragment ions were then used for quantitative MRM analysis. After optimization, the collision energy was set to 44 V. MRM transitions and specific retention times were used to selectively monitor PA.

Statistical Analysis—Number of experiments and repeats are indicated in the figure legends. Normality of the data distribution was verified with analysis of variance test, and statistical analysis was performed with *t* tests relative to the indicated control.

Author Contributions—N. K., E. T., T. T., L. F., D. H., S. C. G., N. J. G., and N. V. performed and analyzed experiments. N. V. and N. J. G. designed the experiments. N. V., N. J. G., and M. F. B. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

Acknowledgments—We thank Valérie Demais for scanning electron microscopy experiments and the microscopy facilities of Plateforme Imagerie In Vitro; Dr. Miles Houslay (King's College, London) for the original GFP-PDE4A1-PABD construct; Dr. S. Friant (CNRS and Université de Strasbourg, France) for yeast DNA; Dr. Bernard Lorber (CNRS and Université de Strasbourg, France) for help with the dynamic light scattering experiments; and Dr. Bruno Antonny for stimulating discussion (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Nice, France). The Metabolome Facility of Bordeaux was supported by Grant MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 from Agence National pour la Recherche.

References

- Liu, Y., Su, Y., and Wang, X. (2013) Phosphatidic acid-mediated signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **991**, 159–176
- Ammar, M. R., Kassas, N., Bader, M. F., and Vitale, N. (2014) Phosphatidic acid in neuronal development: a node for membrane and cytoskeleton rearrangements. *Biochimie* **107**, 51–57
- Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W., and Welti, R. (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* **45**, 250–278
- Jang, J. H., Lee, C. S., Hwang, D., and Ryu, S. H. (2012) Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog. Lipid Res.* **51**, 71–81
- Ammar, M. R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M. F., and Vitale, N. (2013) Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front. Endocrinol.* **4**, 125
- Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haerberlé, A. M., Demais, V., Bailly, Y., Gottfried, L., Nakanishi, H., Neiman, A. M., Du, G., Frohman, M. A., Bader, M. F., and Vitale, N. (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* **282**, 21746–21757
- Jenkins, G. M., and Frohman, M. A. (2005) Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2305–2316
- Dalton, K. A., East, J. M., Mall, S., Oliver, S., Starling, A. P., and Lee, A. G. (1998) Interaction of phosphatidic acid and phosphatidylserine with the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum and the mechanism of inhibition. *Biochem. J.* **329**, 637–646
- Fan, Z., Gao, L., and Wang, W. (2003) Phosphatidic acid stimulates cardiac KATP channels like phosphatidylinositols, but with novel gating kinetics. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C94–C102
- Comoglio, Y., Levitz, J., Kienzler, M. A., Lesage, F., Isacoff, E. Y., and Sandoz, G. (2014) Phospholipase D2 specifically regulates TREK potassium channels via direct interaction and local production of phosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 13547–13552
- Zhang, Y., and Du, G. (2009) Phosphatidic acid signaling regulation of Ras superfamily of small guanosine triphosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 850–855
- 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
- Loewen, C. J., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Delon, C., Ktistakis, N. T., Henry, S. A., and Levine, T. P. (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* **304**, 1644–1647
- Baillie, G. S., Huston, E., Scotland, G., Hodgkin, M., Gall, I., Peden, A. H., MacKenzie, C., Houslay, E. S., Currie, R., Pettitt, T. R., Walmsley, A. R., Wakelam, M. J., Warwicker, J., and Houslay, M. D. (2002) TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca^{2+} -triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **277**, 28298–28309
- Kassas, N., Tryoen-Tóth, P., Corrotte, M., Thahouly, T., Bader, M. F., Grant, N. J., and Vitale, N. (2012) Genetically encoded probes for phosphatidic acid. *Methods Cell Biol.* **108**, 445–459
- Braun, V., Fraiser, V., Raposo, G., Hurbain, I., Sibarita, J. B., Chavrier, P., Galli, T., and Niedergang, F. (2004) TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J.* **23**, 4166–4176
- Czibener, C., Sherer, N. M., Becker, S. M., Pypaert, M., Hui, E., Chapman, E. R., Mothes, W., and Andrews, N. W. (2006) Ca^{2+} and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *J. Cell Biol.* **174**, 997–1007
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J., and Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119–131
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H. P., van der Wel, N., Houben, D., Peters, P. J., de Chastellier, C., et al. (2005) Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* **123**, 157–170
- Bainton, D. F., Takemura, R., Stenberg, P. E., and Werb, Z. (1989) Rapid fragmentation and reorganization of Golgi membranes during frustrated phagocytosis of immobile immune complexes by macrophages. *Am. J. Pathol.* **134**, 15–26
- Iyer, S. S., Barton, J. A., Bourgoin, S., and Kusner, D. J. (2004) Phospholipases D1 and D2 coordinately regulate macrophage phagocytosis. *J. Immunol.* **173**, 2615–2623
- Corrotte, M., Chasserot-Golaz, S., Huang, P., Du, G., Ktistakis, N. T., Frohman, M. A., Vitale, N., Bader, M. F., and Grant, N. J. (2006) Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* **7**, 365–377
- Corrotte, M., Nyguyen, A. P., Harlay, M. L., Vitale, N., Bader, M. F., and Grant, N. J. (2010) Ral isoforms are implicated in FcγR-mediated phagocytosis: activation of phospholipase D by RalA. *J. Immunol.* **185**, 2942–2950
- 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., and Frohman, M. A. (2013) Deficiencies of the lipid-signaling enzymes phospholipase D1 and D2 alter cytoskeletal organization, macrophage phagocytosis, and cytokine-stimulated neutrophil recruitment. *PLoS ONE* **8**, e55325
- Bigay, J., and Antonny, B. (2012) Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev. Cell.* **23**, 886–895
- Pranke, I. M., Morello, V., Bigay, J., Gibson, K., Verbavatz, J. M., Antonny, B., and Jackson, C. L. (2011) α-Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. *J. Cell Biol.* **194**, 89–103
- Kooijman, E. E., Carter, K. M., van Laar, E. G., Chupin, V., Burger, K. N., and de Kruijff, B. (2005) What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry* **44**, 17007–17015

28. Wang, W., Anderson, N. A., Travesset, A., and Vaknin, D. (2012) Regulation of the electric charge in phosphatidic acid domains. *J. Phys. Chem. B* **116**, 7213–7220
29. Andreyev, A. Y., Fahy, E., Guan, Z., Kelly, S., Li, X., McDonald, J. G., Milne, S., Myers, D., Park, H., Ryan, A., Thompson, B. M., Wang, E., Zhao, Y., Brown, H. A., Merrill, A. H., *et al.* (2010) Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J. Lipid Res.* **51**, 2785–2797
30. Potocký, M., Pleskot, R., Pejchar, P., Vitale, N., Kost, B., and Zárský, V. (2014) Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. *New Phytol.* **203**, 483–494
31. Putta, P., Rankenbarg, J., Korver, R. A., van Wijk, R., Munnik, T., Testerink, C., and Kooijman, E. E. (2016) Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 2709–2716
32. Young, B. P., Shin, J. J., Orij, R., Chao, J. T., Li, S. C., Guan, X. L., Khong, A., Jan, E., Wenk, M. R., Prinz, W. A., Smits, G. J., and Loewen, C. J. (2010) Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science* **329**, 1085–1088
33. Horchani, H., de Saint-Jean, M., Barelli, H., and Antonny, B. (2014) Interaction of the Spo20 membrane-sensor motif with phosphatidic acid and other anionic lipids, and influence of the membrane environment. *PLoS ONE* **9**, e113484
34. Hofbauer, H. F., Schopf, F. H., Schleifer, H., Knittelfelder, O. L., Pieber, B., Rechberger, G. N., Wolinski, H., Gaspar, M. L., Kappe, C. O., Stadlmann, J., Mechtler, K., Zenz, A., Lohner, K., Tehlivets, O., Henry, S. A., and Kohlwein, S. D. (2014) Regulation of gene expression through a transcriptional repressor that senses acyl-chain length in membrane phospholipids. *Dev. Cell* **29**, 729–739
35. Huston, E., Gall, I., Houslay, T. M., and Houslay, M. D. (2006) Helix-1 of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A1 regulates its phospholipase-dependent redistribution in response to release of Ca²⁺. *J. Cell Sci.* **119**, 3799–3810
36. Karathanassis, D., Stahelin, R. V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C. M., Cho, W., and Williams, R. L. (2002) Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* **21**, 5057–5068
37. Phillips, M. J., and Voeltz, G. K. (2016) Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 69–82
38. Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S. F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013) PI(4,5)P(2)-dependent and Ca²⁺-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* **153**, 1494–1509
39. Becker, T., Volchuk, A., and Rothman, J. E. (2005) Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 4022–4026
40. Vitale, N., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (2000) GIT proteins, a novel family of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6. *J. Biol. Chem.* **275**, 13901–13906
41. Vitale, N., Moss, J., and Vaughan, M. (1996) ARD1, a 64-kDa bifunctional protein containing an 18-kDa GTP-binding ADP-ribosylation factor domain and a 46-kDa GTPase-activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1941–1944
42. Vitale, N., Caumont, A. S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V. A., Morris, A. J., Frohman, M. A., and Bader, M. F. (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.* **20**, 2424–2434
43. Vitale, N., Moss, J., and Vaughan, M. (1998) Molecular characterization of the GTPase-activating domain of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1). *J. Biol. Chem.* **273**, 2553–2560
44. Vitale, N., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V. J., Riemenschneider, W., Moss, J., and Vaughan, M. (2000) Specific functional interaction of human cytohesin-1 and ADP-ribosylation factor domain protein (ARD1). *J. Biol. Chem.* **275**, 21331–21339
45. Pant, S., Sharma, M., Patel, K., Caplan, S., Carr, C. M., and Grant, B. D. (2009) AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol.* **11**, 1399–1410
46. Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B., and Antonny, B. (2005) Arf-GAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* **24**, 2244–2253
47. Giridharan, S. S., Cai, B., Vitale, N., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2013) Cooperation of MICAL-L1, syndapin2, and phosphatidic acid in tubular recycling endosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1776–1790
48. Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Bailly, Y., Morinaga, N., Frohman, M. A., and Bader, M. F. (2002) Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **159**, 79–89
49. Blich, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917
50. Shui, G., Guan, X. L., Gopalakrishnan, P., Xue, Y., Goh, J. S., Yang, H., and Wenk, M. R. (2010) Characterization of substrate preference for Slc1p and Cst26p in *Saccharomyces cerevisiae* using lipidomic approaches and an LPAAT activity assay. *PLoS ONE* **5**, e11956

III. Discussion

À l'issue de cette étude, nous avons pu montrer que chacun des trois domaines de liaison au PA possède une interaction spécifique avec le PA *in vitro*, mais aussi une affinité préférentielle pour certaines formes de PA (mono- ou polyinsaturées) dans un environnement lipidique propre, laissant entrevoir la possibilité d'utiliser ces domaines polypeptidiques comme des sondes moléculaires pour le PA. Une fois couplées à la GFP, ces sondes présentent une localisation subcellulaire différente dans des macrophages au repos. De plus, après stimulation de la phagocytose, certaines sondes sont recrutées à la membrane plasmique, suggérant la formation ou l'apport de PA aux sites de phagocytose. Plus généralement, ces résultats nous ont permis de valider nos senseurs moléculaires comme des outils essentiels pour suivre la dynamique du PA au sein des membranes.

Au cours de cette discussion, je m'attarderai plus spécifiquement sur les aspects cellulaires de ce travail, c'est-à-dire les informations que nous apportent les diverses localisations des sondes au sein des macrophages, qui ont été moins discutés dans la publication que leur caractérisation biochimique. Les facteurs physico-chimiques influençant la liaison des sondes au PA ont par ailleurs été détaillés dans une revue que nous avons publiée par la suite dans le journal *Biomolécules*, et que vous trouverez en annexe (Tanguy *et al.*, 2018a).

A. Modélisation de l'interaction des PABD avec le PA

Au cours de cette étude, nous avons utilisé trois peptides (Spo20p-PABD, Opi1p-PABD et PDE4A1-PABD), qui ont été identifiés auparavant comme des domaines de liaison au PA (PABD) au sein de deux protéines de levure et une protéine de mammifère, suite à de multiples expériences de mutagenèse ou de délétion. Le PABD de Spo20p comprend les résidus 50 à 91 (Nakanishi *et al.*, 2004), celui de Opi1p les résidus 103 à 191 identifiés comme le « domaine Q2 » (Loewen *et al.*, 2004), et celui de PDE4A1 le domaine TAPAS-1 constitué des 40 premiers résidus en N-ter (Baillie *et al.*, 2002 ; Huston *et al.*, 2006). Pour plus de clarté, j'emploierai dans la suite de cette discussion uniquement la dénomination de ces protéines (Spo20p, Opi1p, et PDE4A1) pour faire référence aux PABD qui en sont issus.

À ce jour, relativement peu de données sont disponibles pour modéliser l'interaction entre le PA et un domaine de liaison protéique spécifique. Au vu de sa composition en acides aminés, Nakanishi et collègues ont émis l'hypothèse que Spo20p puisse prendre la forme d'une hélice α amphipathique, contenant des résidus basiques d'un côté et des résidus hydrophobes de l'autre (Nakanishi *et al.*, 2004). Une approche de résonance magnétique nucléaire a également mis en évidence la présence d'une hélice amphipathique au niveau de la région N-ter de la protéine PDE4A1 (Smith *et al.*, 1996). Or la formation d'une hélice amphipathique au niveau de la structure secondaire des protéines est connue pour favoriser l'interaction de nombreux effecteurs

protéiques avec les feuilletts cytosoliques des membranes, chargés négativement (Giménez-Andrés *et al.*, 2018). Une telle structure pourrait alors être responsable de l'affinité des sondes avec le PA. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé une approche bio-informatique permettant de réaliser une projection hélicoïdale de la structure des PABD Spo20p, Opi1p et PDE4A1. De façon intéressante, les résultats de cette modélisation montrent que les 3 sondes du PA semblent bien partager une organisation en hélice α amphipathique.

Ces données permettent alors de proposer un modèle général de l'interaction des PABD avec le PA, dans lequel les acides aminés hydrophiles situés d'un côté de l'hélice interagiraient avec les têtes polaires des molécules de PA, chargées négativement, alors que les acides aminés hydrophobes pourraient s'insérer entre les chaînes d'acides gras des phospholipides. En accord avec ce modèle, les résultats d'une simulation de dynamique moléculaire indiquent qu'en présence de 10% de PA dans une bicouche de PC, la plupart des résidus hydrophobes de Spo20p sont enchâssés dans la membrane, alors que les résidus basiques interagissent avec les têtes polaires des molécules de PA (Potocký *et al.*, 2014). En utilisant la même approche, des observations similaires ont pu être obtenues récemment pour Opi1p (Hofbauer *et al.*, 2018). Il est tout de même important de rappeler que ce modèle reste théorique tant que cette organisation n'a pas pu être observée dans un contexte cellulaire. Des études récentes de spectroscopie (dichroïsme circulaire) ont ainsi permis de confirmer la formation d'une hélice α amphipathique au contact du PA pour Spo20p et Opi1p (Horchani *et al.*, 2014 ; Hofbauer *et al.*, 2018).

B. Validation de la spécificité des senseurs pour le PA

Afin de pouvoir étudier le comportement de senseurs moléculaires dans un contexte cellulaire, il est tout d'abord nécessaire de s'assurer de la spécificité de ces senseurs. C'est particulièrement le cas pour les senseurs du PA, qui ne présentent pour la plupart pas de domaine de reconnaissance consensus, et dont la spécificité pour le PA a parfois été remise en question.

Selon le modèle décrit ci-dessus, l'affinité des PABD pour le PA serait médiée essentiellement par des interactions électrostatiques. Cela pose un problème de spécificité des sondes, qui pourraient alors interagir avec d'autres lipides chargés négativement tels que la PS ou les PIP. Avant d'entreprendre la caractérisation de ces sondes, nous avons ainsi validé leur spécificité pour le PA. Pour cela nous avons produit des protéines recombinantes couplées à la GST et nous avons effectué des tests de liaison au PA. La protéine GST seule a été utilisée comme contrôle négatif, puisque cette protéine ne lie pas le PA ou les autres lipides.

Des membranes de nitrocellulose sur lesquelles divers lipides ont été adsorbés ont été utilisées en premier lieu car elles permettaient de tester rapidement la liaison des protéines à un très large panel de lipides. Cet essai a clairement mis en évidence une liaison préférentielle des sondes au PA par rapport aux autres lipides. Les PIP sont cependant également faiblement reconnus par les 3 sondes (4 fois moins que le PA), les valeurs les plus élevées concernant le

PI(4,5)P₂. Cette liaison annexe des PABD au PI(4,5)P₂ est la principale source de critique à l'utilisation des PABD comme senseur moléculaire du PA. Ces résultats concordent avec les observations précédentes obtenues grâce à cet essai, en particulier pour Spo20p (Nakanishi *et al.*, 2004 ; Kassas *et al.*, 2012). Cependant cet essai *in vitro* peut être faussé par la concentration des lipides utilisés et l'absence d'organisation en bicouche. En effet, pour étudier de manière appropriée une liaison phospholipide-protéine, il est essentiel de visualiser la spécificité dans un contexte membranaire.

Nous avons ainsi complété ces données par l'utilisation de liposomes, préparés par la méthode d'extrusion. Cette méthode est préférable à la sonication qui produit également des vésicules multilamellaires. Or la présence de ces vésicules peut fausser les études de liaison car la concentration du substrat n'est pas contrôlée. L'homogénéité de ces préparations a également été validée par des observations en microscopie confocale et de diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*, DLS), une technique permettant d'obtenir la distribution de la taille des liposomes. Afin de mesurer la liaison des PABD aux membranes, nous avons notamment utilisé des liposomes fluorescents, selon un nouvel essai développé au laboratoire. Cet essai permet des mesures semi-quantitatives plus fiables, rapides et reproductibles comparées aux expériences classiques de flottation. Pour effectuer ces tests, nous avons préparé des liposomes contenant 85% de PC, 5% de PE couplé à un fluorochrome (NBD) et 10% de PA ou de PI(4,5)P₂. Ces liposomes ont été incubés avec les sondes du PA couplées à la GST et liées à des billes de glutathion-sépharose (GSH), ou avec la GST-GSH seule. Des étapes de centrifugation permettent ensuite d'éliminer les liposomes non liés aux sondes-GST. Après lavage des billes, la fluorescence du NBD, reflétant celle des liposomes liés aux sondes, a été mesurée en fluorimétrie. L'incubation avec la GST seule ne donne pas de signal de fluorescence significatif, validant la liaison des liposomes avec les senseurs. De plus, la fluorescence propre des billes GSH seules a été mesurée en contrôle. L'ensemble des tests effectués a montré une nette préférence des sondes pour le PA plutôt que le PI(4,5)P₂, en particulier pour Spo20p et Opi1p qui se lient plus fortement aux liposomes contenant du PA que PDE4A1. Nous avons pu observer que la sonde Spo20p présente une sensibilité élevée au PA, en accord avec les résultats d'une autre étude de liaison effectuée avec des liposomes incubés avec une sonde contenant deux domaines Spo20p et couplée au NBD (Horchani *et al.*, 2014).

Enfin, dans l'objectif de visualiser l'expression de ces sondes dans les cellules, nous avons généré par mutagenèse dirigée des formes mutées décrites comme ayant perdu leur affinité pour le PA, qui serviront de contrôle négatif : Spo20p(L67P) (Nakanishi *et al.*, 2004), PDE4A1(W19A-W20A) (Baillie *et al.*, 2002) et OpiQ2(K126M-R127G) (Loewen *et al.*, 2004). En accord avec ces données, le test de liaison aux liposomes fluorescents en utilisant ces mutants couplés à la GST a révélé une forte diminution de l'affinité pour le PA par rapport aux sondes non mutées. Ces

mutations se situent au niveau de l'hélice amphipathique pour les 3 sondes, ce qui confirme la nécessité de cette structure pour la liaison au PA.

C. Localisation des PABD dans les macrophages RAW 264.7 non stimulés

Les trois sondes du PA ainsi que leurs formes mutantes ont ensuite été exprimées dans des macrophages RAW 264.7, grâce à des constructions de protéines de fusion couplées à la GFP. Afin d'appréhender la dynamique du PA durant la phagocytose, nous avons étudié la distribution de ces différentes sondes par microscopie confocale. À notre connaissance, aucune étude comparative de ce type n'avait encore été effectuée pour différentes sondes du PA. Notre étude a permis de montrer que les trois sondes du PA étudiées possèdent une localisation subcellulaire différente dans les macrophages RAW 264.7 non stimulés. Nous avons déterminé le compartiment ciblé par des expériences de colocalisation réalisées à l'aide d'immunomarquages avec des marqueurs spécifiques.

Dans les macrophages non stimulés, nous avons pu observer que la sonde Spo20p se localise majoritairement au niveau du noyau ainsi que plus faiblement à la membrane plasmique, la sonde Opi1p au niveau du RE et du noyau, et la sonde PDE4A1 s'accumule au niveau de l'appareil de Golgi. Ces préférences de localisations correspondent à ce qui a été décrit dans les publications de caractérisation initiales des sondes. Elles ne sont donc pas imputables à une différence inter-espèce ou même de type cellulaire. Par ailleurs, ces 3 sondes exprimées dans des cellules sécrétrices de type PC12 présentent la même localisation au repos que dans les macrophages RAW 264.7 (thèse de Nawal Kassas). Les variations de localisation observées pourraient correspondre plutôt à des liaisons préférentielles des sondes avec des membranes de différentes composition lipidique, comme nous avons pu le mettre en évidence en modifiant les caractéristiques des liposomes lors des tests de liaison (voir revue [Tanguy et al., 2018a](#)). L'incubation de ces sondes avec des fractions membranaires purifiées ayant subi une protéolyse a confirmé que cette interaction est dépendante des composants lipidiques des membranes. De plus, les propriétés de liaison des sondes que nous avons mises en évidence coïncident avec les propriétés membranaires des compartiments cibles (RE, appareil de Golgi et membrane plasmique). Par exemple, nos résultats *in vitro* ont montré que la sonde Opi1p possède une affinité supérieure pour le PA lorsqu'il est inclus dans des membranes de rigidité faible et de courbure élevée. Ceci est bien compatible avec les caractéristiques physico-chimiques de la membrane du RE, riche en lipides insaturés, pauvre en cholestérol et présentant des défauts de compactage des phospholipides ([Bigay et Antonny, 2012](#)).

De façon intéressante, une faible proportion de la sonde Spo20p a été détectée à la membrane plasmique, en accord avec une précédente étude réalisée au laboratoire ([Kassas et al., 2012](#)). En accord avec cette localisation périphérique, une étude réalisée par le groupe de Sergio Grinstein a rapporté que contrairement aux autres types cellulaires, les macrophages possèdent

la particularité de présenter des niveaux de PA élevés à la membrane plasmique au repos, synthétisés sous l'action de la DGK (Bohdanowicz *et al.*, 2013). Ces auteurs ont néanmoins observé un marquage restreint à la membrane plasmique, probablement dû à la modification de la sonde par l'ajout d'une séquence d'export nucléaire qui facilite sa sortie du noyau et ainsi son accès à la membrane plasmique. La sonde Opi1p quant à elle est localisée au niveau du RE, mais présente également une localisation fortement nucléaire. Il semble que l'accumulation d'Opi1p et Spo20p au niveau du noyau puisse être due à des similitudes entre les domaines de liaison au PA et une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Nakanishi *et al.*, 2004 ; Stace et Ktistakis, 2006). Cependant ce recrutement pourrait être dû en partie à la formation de PA dans la membrane interne nucléaire. En effet, une activation de la PLD au niveau du noyau a été retrouvée dans plusieurs types cellulaires (Balboa et Insel, 1995 ; Baldassare *et al.*, 1997).

Les sondes présentant une mutation ponctuelle les empêchant de lier le PA ne montrent plus de colocalisation spécifique avec un compartiment mais une distribution cytosolique diffuse, ce qui confirme que le ciblage des compartiments membranaires provient d'une interaction de l'hélice amphipathique avec le PA. Par ailleurs, les cellules exprimant les domaines Spo20p ou Opi1p mutés démontrent également une accumulation nucléaire des sondes, ce qui est en faveur d'un adressage nucléaire aspécifique. L'approche originale de spectroscopie de masse que nous avons utilisée en parallèle nous a notamment permis de quantifier le degré global de PA dans les compartiments subcellulaires. En accord avec la localisation des sondes Spo20p et Opi1p, des niveaux significatifs de PA ont été mesurés au niveau de la membrane plasmique et du RE. Des mesures semblables effectuées sur la même lignée ont également révélé la présence de PA dans ces compartiments, bien que les quantités obtenues diffèrent (Andreyev *et al.*, 2010).

D. Dynamique du PA après stimulation de la phagocytose FcγR-dépendante

La phagocytose médiée par les récepteurs FcγR est un processus essentiel de la réponse immunitaire innée, permettant aux cellules immunitaires comme les macrophages d'éliminer les agents indésirables (Botelho et Grinstein, 2011). À la suite de la liaison des IgG sur leurs récepteurs, la transduction du signal conduit à des réarrangements du cytosquelette entraînant l'extension de pseudopodes autour de la particule pour former le phagosome (Niedergang et Grinstein, 2018). Le comportement des senseurs du PA durant les premières étapes de la phagocytose a été observé grâce à l'utilisation d'un protocole de phagocytose frustrée, dans lequel les macrophages sont déposés sur une lamelle de verre préalablement recouverte par de la BSA (*bovine serum albumin*), puis des IgG anti-BSA. Ce protocole imite la stimulation des FcγR par des particules opsonisées en suspension, mais ne permet pas l'internalisation des particules. Après une incubation à 37°C, on observe ainsi un étalement des macrophages sur la lamelle, les cellules augmentant leur surface comme pour essayer d'entourer ces particules (Marion *et al.*, 2012). Cette méthode est donc adaptée à l'étude des mécanismes de formation des phagosomes. Comme

contrôle, les cellules ont été placées sur la BSA seule à 37°C. Elles restent ainsi plutôt circulaires et ne forment pas d'extensions. Un premier contrôle envisagé était de placer les cellules sur la lamelle recouverte d'anticorps anti-BSA et de les incubé à 4°C. Cependant cette température induisait le détachement quasi-total des cellules durant les étapes de lavages et s'est révélée incompatible avec l'immunofluorescence.

Ce protocole de stimulation de la phagocytose induit un recrutement à la membrane plasmique pour deux des sondes du PA, Spo20p et Opi1p, couplé à une diminution de la localisation initiale de ces sondes, suggérant ainsi l'apparition de PA aux sites de phagocytose. Lorsque les cellules sont stimulées, la localisation des mutants de Spo20p, de PDE4A1 et Opi1p ne semble pas être modifiée (données non montrées). Ainsi il semble que la translocation des sondes à la membrane plasmique lors de la phagocytose requiert une interaction avec le PA. En réalisant des plans basaux, nous avons également observé la présence de marquages fluorescents punctiformes dans les cellules exprimant ces sondes, bien qu'en plus faible proportion pour Opi1p. Les IgG étant distribuées de manière homogène sur la lamelle, il est tout à fait probable que ces punctuations reflètent les sites d'interaction entre les IgG et les FcγR, où la signalisation de phagocytose est engagée. Néanmoins, il est également possible qu'elles correspondent à des sites d'adhésion, puisqu'il a été rapporté que des microdomaines de PA formés par la PLD interviennent dans la formation des podosomes (Iyer *et al.*, 2006 ; Bolomini-Vittori *et al.*, 2019). Cette question pourrait être résolue en effectuant des plans basaux de cellules incubées sur les IgG à 4°C.

Le recrutement très net de la sonde Spo20p à la membrane plasmique au cours des premières étapes de la phagocytose suggère la synthèse de PA au niveau du phagosome nouvellement formé. Ces résultats sont en accord avec les expériences antérieures réalisées par Corrotte *et al.* (2006) avec une stimulation par des billes de latex opsonisées par des IgG. L'utilisation du PABD de la protéine Raf1 dans cette étude a cependant indiqué la présence de PA au niveau du phagosome internalisé, ce que nous n'observons pas avec la sonde Spo20p (Kassas *et al.*, 2012). Au vu de nos résultats sur la caractérisation biochimique des sondes, une explication possible serait que les deux sondes aient des propriétés d'affinité différentes avec le PA.

Notre étude démontre pour la première fois un recrutement de la sonde Opi1p à la membrane plasmique, ce qui pourrait indiquer un apport de PA provenant du RE. De façon intéressante, ce recrutement n'a pas été observé lorsque les cellules ont été stimulées avec des billes de latex de 3 µm couplées à des IgG (thèse de Nawal Kassas). En revanche, dans cette condition de stimulation, la sonde Opi1p semble se déplacer du RE vers le noyau, puisqu'une forte augmentation de fluorescence au niveau du noyau concomitant à une réduction au niveau du RE a été observée après stimulation. Ce résultat est à mettre en perspective avec les travaux précédents réalisés chez la levure et qui ont identifié la protéine Opi1p comme un régulateur du

métabolisme des phospholipides. Dans la levure, la protéine Opi1p complète est localisée à la périphérie du noyau et au niveau du RE. En présence d'inositol, qui va entraîner la consommation du PA dans le RE pour former des PIP, la sonde se détache du RE et transloque vers le noyau afin de réguler la transcription d'enzymes du métabolisme lipidique (Loewen *et al.*, 2004 ; Henry *et al.*, 2012). Ces observations laissent donc penser que la phagocytose d'une particule conduit à une baisse de la quantité de PA au niveau du RE dans les macrophages RAW 264.7. Mais nos résultats suggèrent également que le recrutement de la sonde Opi1p au niveau des sites de phagocytose dépend de la méthode de stimulation utilisée.

Les données d'immunofluorescence laissent entrevoir une modification des niveaux de PA présents dans la membrane plasmique et le RE lors de la phagocytose. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé l'approche de spectrométrie de masse décrite précédemment, après stimulation de la phagocytose frustrée. En lien avec les observations de microscopie, ces analyses de lipidomique révèlent une augmentation du PA global au niveau de la membrane plasmique, et une diminution concomitante de PA dans le RE. Des résultats inverses ont été obtenus *via* la stimulation des TLR par une molécule analogue du LPS, suggérant une variation de régulation du métabolisme du PA en fonction du type de stimulation (Andreyev *et al.*, 2010). Ces auteurs ont toutefois montré une élévation du PA monoinsaturé (36:1) au niveau de la membrane plasmique, ce qui concorde avec les mesures spécifiques des différents types de PA que nous avons également effectuées.

E. Un rôle du PA provenant du RE dans la phagocytose ?

La translocation de la sonde Opi1p au niveau de la membrane plasmique pourrait suggérer un recrutement de membranes du RE au cours de la phagocytose. Au cours de la formation du phagosome, on observe un phénomène d'exocytose focale qui permet l'extension des pseudopodes et la compensation de l'internalisation du phagosome (Holevinski et Nelson, 1998). La participation de différents types d'endomembranes à cette expansion de la membrane plasmique a été proposée, dont le RE (Gagnon *et al.*, 2002 ; Becker *et al.*, 2005). Bien que très débattus, des premiers travaux effectués par le groupe de Desjardins ont mis en évidence que la signalisation induite par l'activation des FcR conduit au recrutement du RE en périphérie cellulaire, où il fusionnerait avec la membrane plasmique afin de pouvoir fournir de la membrane pour englober la particule à dégrader. Des études ont ensuite montré que des marqueurs caractéristiques du RE, comme la syntaxine 18, était recrutés au niveau du phagosome naissant et que cela influençait le degré d'ingestion des particules (Hatsuzawa *et al.*, 2006). Il a notamment été proposé que la contribution du RE à la phagocytose soit liée à la taille des particules à ingérer, et qu'elle se produise suite à l'ingestion de larges particules lorsque la demande en membranes dépasse la capacité des autres sources (Becker *et al.*, 2005).

Le fait que la sonde Opi1p soit recrutée à la membrane plasmique dans les conditions de phagocytose frustrée mais pas lors de la stimulation avec des billes couplées à des IgG apporterait un nouvel éclairage sur le rôle du RE lors de la phagocytose de très grandes particules. En effet, dans les conditions de phagocytose frustrée, la lamelle entière représente alors la « particule », et du fait qu'il n'y ait pas d'internalisation possible, on observe une extension progressive des pseudopodes. Ainsi on peut supposer que dans ces conditions, l'apport membranaire aux sites de contacts entre les IgG et les FcγR pourra être amplifié par l'activation prolongée des FcγR. La réduction dramatique des niveaux de PA dans le RE durant la phagocytose frustrée et l'augmentation en parallèle du PA dans la membrane plasmique valideraient ainsi le concept d'une fusion d'une partie de la membrane du RE avec la membrane plasmique. Mais d'autres possibilités peuvent être considérées, telles que l'apport d'enzymes de synthèse du PA à la membrane plasmique, ou encore un recrutement du RE au niveau de sites de contact membranaires qui permettraient un transfert direct de lipides. En lien avec cette hypothèse, un transfert de PA dépendant d'Opi1p a été observé entre le RE et la mitochondrie (Gaspar *et al.*, 2017).

IV. Conclusion et perspectives

L'étude de la localisation de sondes du PA a montré une répartition différente des différentes sondes du PA testées, ainsi qu'un déplacement spécifique de certaines après stimulation de la phagocytose. Une des limites de ce travail est l'observation de cellules fixées. En effet, la dynamique de recrutement des sondes serait mieux reflétée par des protocoles d'imagerie sur cellules vivantes adaptés à des processus rapides, en utilisant par exemple la microscopie confocale à *spinning disk* (Masters *et al.*, 2013) ou la microscopie TIRF (*total internal reflection fluorescence*) (Marie-Anaïs *et al.*, 2016). De plus, nous n'avons pas étudié dans quelle mesure notre protocole de phagocytose frustrée active la signalisation de phagocytose. Il serait notamment intéressant d'effectuer des mesures d'activité enzymatique telle que la mesure de l'activité de la PLD après avoir stimulé les macrophages de cette façon, et de comparer ceci aux données obtenues précédemment avec un protocole plus classique d'ajout de billes opsonisées (Kusner *et al.*, 1999).

Les résultats des tests de liaison, non détaillés ici, suggèrent également que ces senseurs pourraient servir de sonde spécifique pour les différentes espèces de PA, et seraient des outils utilisables pour étudier leur implication potentielle dans un processus. Par ailleurs, ils valident le concept que les différentes espèces de PA pourraient être impliquées dans des fonctions biologiques distinctes (Hodgkin *et al.*, 1998). L'utilisation ultérieure de ces sondes pourra certainement mettre en lumière les multiples localisations et fonctions du PA au sein des cellules, ainsi que les mécanismes qui permettent à des protéines multiples de lier spécifiquement le plus simple des phospholipides.

Enfin, l'observation d'une formation de PA au niveau des sites de phagocytose confirme le rôle majeur de ce lipide dans ce processus. Cette génération de PA peut être médiée par l'activité de plusieurs enzymes, dont les DGK et les PLD qui ont été impliquées dans la phagocytose (Corrotte *et al.*, 2006 ; Bohdanowicz *et al.*, 2013). Afin de déterminer plus en détail son mode de production, il est nécessaire d'étudier la signalisation menant à l'activation des enzymes du métabolisme du PA.

Publication 2 :

Régulation de la PLD par la GTPase Arf6 au cours de la phagocytose

I. Objectifs de l'étude

Les expériences réalisées sur la dynamique du PA dans l'étude précédente ont montré une modification majeure des niveaux de ce lipide dans divers compartiments au cours de la phagocytose. À la suite de ces travaux, je me suis alors intéressée à la régulation en amont de la formation du PA, et notamment à l'activation des PLD. En effet, ces enzymes ont été identifiées comme responsables de la production du PA au niveau des sites de phagocytose et notre équipe a pu démontrer qu'elles jouent un rôle fondamental dans l'internalisation FcγR-dépendante des particules (Corrotte *et al.*, 2006). Cependant, les mécanismes menant de l'activation des récepteurs phagocytaires à celle des PLD restent en grande partie à élucider. La phagocytose est un processus extrêmement complexe et finement régulé, en particulier lors de la première étape de formation du phagosome. Parmi les acteurs qui ont été identifiés, différentes GTPases ont été impliquées dans la phagocytose, et en premier lieu Arf6 (Zhang *et al.*, 1998). Cette GTPase joue notamment un rôle dans l'exocytose focale d'endomembranes, nécessaire à l'extension des pseudopodes (Niedergang *et al.*, 2003). Néanmoins, bien que l'implication d'Arf6 au cours de la phagocytose ait été largement démontrée, ses rôles précis restent à éclaircir. Une question essentielle reste ainsi la caractérisation de ses effecteurs.

Plusieurs pistes nous ont amené à émettre l'hypothèse que l'une des cibles d'Arf6 dans les macrophages stimulés soit la PLD. Premièrement, des études *in vitro* ont montré qu'Arf6 intervient dans l'activation des isoformes PLD1 et PLD2 (Anthes *et al.*, 1991 ; Lopez *et al.*, 1998). De plus, les protéines Arf6 et PLD partagent des fonctions essentielles aux mécanismes de phagocytose, telles que le remodelage du cytosquelette d'actine. Nous avons également pu montrer auparavant que la GTPase RalA régulait le processus de phagocytose *via* une activation des PLD (Corrotte *et al.*, 2010). Enfin, Arf6 est un activateur connu de la PLD dans le processus d'exocytose régulée (Vitale *et al.*, 2002 ; Béglé *et al.*, 2009).

Dans le cadre de la phagocytose, la relation entre Arf6 et activation de la PLD n'a pas encore été établie. Nous avons alors cherché à savoir s'il existe une régulation de la PLD par Arf6 pendant la phagocytose. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé à nouveau le modèle de macrophages RAW 264.7. Ces cellules ont été stimulées avec des billes de latex ou des particules de zymosan couplées à des IgG pour déclencher la phagocytose. Nous avons tout d'abord caractérisé la cinétique d'activation d'Arf6 suite à l'activation des FcγR. De plus, en utilisant une construction d'Arf6 couplée à la GFP, nous avons pu observer sa dynamique au cours

de la phagocytose. Ensuite, nous avons cherché à démontrer une interaction entre Arf6 et les deux isoformes de la PLD pendant la phagocytose en observant leur localisation en microscopie confocale, mais également *via* des expériences d'immunoprécipitation. Afin de tester l'implication d'Arf6 endogène dans la régulation de l'activité des PLD au cours de la phagocytose, nous avons utilisé une approche d'ARN interférence. Après la stimulation des macrophages, des mesures de l'activité PLD ont été effectuées dans le but de comparer le niveau d'activité de cette enzyme dans les cellules avec ou sans déplétion d'Arf6. Par ailleurs, nous avons complété ces dosages en examinant l'effet de la réduction de l'expression d'Arf6 sur la production du PA au niveau des phagosomes naissants, à l'aide d'une des sondes du PA caractérisées précédemment.

Ce projet a été initié par An Phu Tran Nguyen sous la direction du Dr Nancy Grant, dont le travail a permis de dégager des résultats préliminaires prometteurs concernant l'implication d'Arf6 dans la formation du phagosome et son interaction avec les PLD pendant la phagocytose. J'ai poursuivi ce travail en réalisant dans un premier temps les réplicats nécessaires à la validation de la plupart de ces données, et dans un second temps en effectuant les acquisitions en vidéomicroscopie du recrutement d'Arf6-GFP, ainsi que la mise au point de la quantification de l'activité PLD après stimulation de la phagocytose.

II. Résultats et discussion

Les résultats obtenus et leur discussion sont exposés dans la publication que vous trouverez à partir de la page suivante, et que je signe en co-premier auteur :

Regulation of Phospholipase D by Arf6 during FcγR-mediated Phagocytosis.

Tanguy E.*, Tran Nguyen A. P.*, Kassas N., Bader M.-F., Grant N. J., and Vitale N. (* co-first authors)
Journal of Immunology, 2019 May 15; 202(10):2971-2981

Regulation of Phospholipase D by Arf6 during FcγR-Mediated Phagocytosis

Emeline Tanguy,¹ An Phu Tran Nguyen,¹ Nawal Kassas, Marie-France Bader, Nancy J. Grant, and Nicolas Vitale

Phagocytosis is an essential element of the immune response, assuring the elimination of pathogens, cellular debris, and apoptotic and tumoral cells. Activation of phagocytosis by the FcγR stimulates phospholipase D (PLD) activity and triggers the production of phosphatidic acid (PA) at the plasma membrane of macrophages, but the regulatory mechanisms involved are still not clearly understood. In this study, we examined the role of the small GTPase Arf6 in the activation of the PLD isoforms during FcγR-mediated phagocytosis. In RAW 264.7 macrophage cells, expressed Arf6-GFP partially colocalized with PLD1-hemagglutinin on intracellular membrane-bound vesicles and with PLD2-hemagglutinin at the plasma membrane. Both PLD isoforms were found to interact with Arf6 during FcγR-mediated phagocytosis as seen by immunoprecipitation experiments. In macrophages stimulated for phagocytosis, Arf6 was observed to be associated with nascent phagosomes. RNA interference knockdown of Arf6 reduced the amount of active Arf6 associated with phagosomes, revealed by the MT2-GFP probe that specifically binds to Arf6-GTP. Arf6 silencing concomitantly decreased PLD activity as well as the levels of PA found on phagosomes and phagocytic sites as shown with the PA probe Spo20p-GFP. Altogether, our results indicate that Arf6 is involved in the regulation of PLD activity and PA synthesis required for efficient phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 2019, 202: 000–000.

Specialized immune cells, such as macrophages, polymorphonuclear granulocytes, and dendritic cells, internalize and degrade large particles (>0.5 μm) such as pathogens and cellular debris by phagocytosis. This process is initiated by the binding of particle-associated ligands to specific receptors and lectins on the phagocyte surface. Subsequent clustering of these receptors stimulates tyrosine kinases, which in turn trigger an activation cascade that has been best described for the Fcγ portion of the Ig receptor (FcγR) (1). This cascade initiates the extension of pseudopods forming a “phagocytic cup” around the particle to generate a phagosome, the vacuole in which the particle is engulfed. Following internalization, the phagosome matures into a phagolysosome, which leads to the acidification of the vacuole, degradation of the ingested material, and eventual recycling of ligands for Ag presentation (2). Membrane homeostasis during phagocytosis is maintained by focal exocytosis (3) of endomembranes inserted into the plasma membrane, a process that requires extensive actin cytoskeleton remodeling (4) and membrane fusion events (5).

Membrane trafficking is essential for phagocytosis during both the formation and maturation of the phagosome. Different intracellular compartments, including early and late endosomes, lysosomes (6), and the endoplasmic reticulum (7), have been proposed as membrane sources for focal exocytosis at phagocytic sites. Formation of SNARE complexes between the plasma membrane and vesicular structures arising from these compartments are necessary for this focal exocytosis (8, 9). In addition, different lipids, including phosphoinositides and phosphatidic acid (PA) (10, 11), contribute to phagosome formation, internalization, and maturation. Using specific sensors, we have previously demonstrated that PA is produced and accumulates at phagocytic sites (12–14). Although diacylglycerol kinases may be an important source of PA during phagocytosis (15), an increase in phospholipase D (PLD) activity, which generates PA from phosphatidylcholine, has also been reported during the activation of several phagocytic receptors, including the FcγR (16, 17). Both PLD1 and PLD2 isoforms seem to be necessary for efficient phagocytosis (12). In RAW 264.7 macrophages, PLD2 is present at the plasma membrane, whereas PLD1 associated with the late endosome/lysosome compartment is recruited to phagocytic sites (12), suggesting a sophisticated regulation of PLD activity and PA synthesis during phagocytosis. Interestingly, PLD1 and PLD2 have also been shown to regulate different steps in FcεRI-mediated degranulation and anaphylactic reactions in mast cells (18–20), suggesting a widespread critical role for PLDs in immune cell functions. Note that immune cell activities are tightly controlled functions, which makes the issue of PLD regulation during immune responses particularly interesting.

Monomeric GTPases are master regulators of membrane trafficking processes, including receptor-mediated endocytosis, endosomal recycling, and exocytosis of secretory granules (21–23). The first GTPase that has been directly implicated in phagocytosis, in particular in the delivery of endomembranes to forming phagosomes, was the ADP ribosylation factor (Arf) 6 (24–26). Yet, the downstream pathway by which Arf6 participates in

Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France

¹E.T. and A.P.T.N. contributed equally to the work.

ORCID: 0000-0002-4752-4907 (N.V.).

Received for publication July 23, 2018. Accepted for publication March 11, 2019.

This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale (to N.V.).

A.P.T.N., E.T., N.K., and N.J.G. performed and analyzed experiments. N.V. and N.J.G. designed the experiments. N.V., M.-F.B., and N.J.G. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Nicolas Vitale, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 5 Rue Blaise Pascal, Strasbourg 67000, France. E-mail address: vitalen@unistra.fr

Abbreviations used in this article: Arf, ADP ribosylation factor; GGA3, Golgi-localized γ-adaptin ear homology Arf binding protein 3; HA, hemagglutinin; PA, phosphatidic acid; PLD, phospholipase D; PtdIns(4,5)P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; RNAi, RNA interference; siRNA, small interfering RNA.

Copyright © 2019 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/19/\$37.50

Fc γ R-dependent phagocytosis is still unknown. GTPases, together with protein kinase C, are also the best-characterized regulators of PLD. Initially, only PLD1 activity was thought as being regulated by these GTPases because of the high basal activity of PLD2. However, it was later shown that activities of both PLD isoforms are subject to regulation (27). Altogether, these findings prompt us to investigate whether Arf6 might be implicated in phagocytosis by regulating PLD activity and PA synthesis. We show, in this study, that Arf6 and PLDs partially colocalize and interact in macrophages undergoing phagocytosis. Arf6 silencing effectively reduces PLD activation and PA synthesis at the phagocytic sites, consistent with the idea that Arf6 contributes to optimal phagocytosis through the regulation of PLD.

Materials and Methods

Reagents and Abs

RPMI 1640 and FBS were purchased from Invitrogen. Latex beads (3 μ m; Sigma-Aldrich) were coated with human IgG (Zymed). *Escherichia coli* coupled to Alexa Fluor 594 and zymosan particles were purchased from Molecular Probes. Rat anti-hemagglutinin (HA) affinity matrix was purchased from Roche. The following mAbs were used: anti-Arf6 (mouse IgG2b; Santa Cruz Biotechnology), anti-Arf1 (mouse IgG2a; Abcam), anti-CD64 (rat IgG2b; R&D Systems), anti-HA (mouse IgG1, HA.11; Covance), anti-GFP (mouse IgG1; Roche), anti- β -actin (mouse IgG1, clone AC-15; Sigma-Aldrich), and anti- β -tubulin (mouse IgG1, clone TUB 2.1; Sigma-Aldrich). Polyclonal anti-Arf6 (rabbit; Bethyl Laboratories) was also used for immunoblots. Goat secondary Abs coupled to Alexa Fluor 555 or 568 (Molecular Probes) or to peroxidase (Thermo Fisher Scientific) were used for immunofluorescence and immunoblots, respectively.

Cell culture

Culture conditions for the murine macrophage RAW 264.7 cell line in RPMI 1640 glutamax medium supplemented with 10% FBS were as previously described (12–14).

Plasmids and transfection

Arf6-pEGFP and small interfering RNA (siRNA)-resistant Arf6-HA-pXS and Arf6(N48I)-HA-pXS were described previously (23, 28). The plasmids pCGN-human PLD1 (PLD1-HA) and pCGN-mouse PLD2 (PLD2-HA) were described previously (29). MT2-GFP was used to visualize the localization of the active form of Arf6 (28). Similarly, Spo20p-GFP served as a probe to detect sites of PA production (30). RAW 264.7 cells were transfected with the plasmids by electroporation (12) or using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). For confocal experiments, RNA interference (RNAi)-treated macrophages were collected, replated on glass inserts in 35-mm Petri boxes (Maktek), and transfected with MT2-GFP or Spo20-GFP.

Stimulation of phagocytosis and phagocytosis assay

IgG-opsonized 3- μ m latex particles (IgG beads) or *E. coli* particles, washed with PBS and resuspended in medium, were added to cells grown on glass coverslips (20 beads per cell or 50 *E. coli* per cell). For these assays, phagocytosis was synchronized after adding particles by centrifuging cells for 2 min at $100 \times g$ at 18°C and then initiating phagocytosis by placing them at 37°C as previously described (12). Briefly, phagocytosis was stopped 30 min later by washing twice in cold PBS. Fluorescence of noninternalized *E. coli* was bleached by trypan blue 0.4%. After fixation, external beads were labeled with goat anti-human IgG coupled to Alexa Fluor 555 (Molecular Probes). Unlabeled internalized beads were visualized with phase contrast optics (Axio Imager 2; ZEISS). The mean number of internalized beads or the mean fluorescence intensity (for *E. coli* assay) per cell was determined for randomly chosen fields (minimum of 80 cells for each field) using superimposed fluorescent and phase contrast images (Adobe Photoshop 9). The phagocytic index was normalized to 100% for cells transfected with the control RNAi.

Arf activation assay

Phagocytosis was initiated by adding IgG-opsonized particles to 1×10^7 cells in suspension at 37°C and stopped at different times ($t = 0, 5, 10, \text{ and } 20$ min) as previously described (31). For each time point, Arf-GTP was precipitated

from lysates (2 mg total protein) with the Arf-GTP binding domain of Golgi-localized γ -adaptin ear homology Arf binding protein 3 (GGA3) linked to GST, according to the instructions in the Arf Activation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Control samples with or without the addition of opsonized particles were maintained at 4°C. Arf-GTP precipitates and aliquots of total cell lysates (10–20 μ g protein) were analyzed on immunoblots using Abs against Arf6, Arf1, and actin.

Immunoprecipitation of PLD

Macrophages were transfected with Arf6-GFP and either PLD1-HA, PLD2-HA, or β PIX-HA, and cells were collected 24 h later. Phagocytosis was then initiated by adding IgG beads to the cell suspensions (5×10^6 cells) at 37°C for different times, and cell lysates were then prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 0.5% Triton X-100, 0.5% DOC, and protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich). PLD proteins were immunoprecipitated from lysates (0.5 mg protein) using rat Anti-HA Affinity Matrix (Roche) and analyzed by immunoblots.

RNAi

Macrophages were transfected with 40 pmoles of a stealth RNAi duplex specific for mouse Arf6 (duplex A: 5'-GGAACAAGGAAATGCGGATCC-TCA-3'; duplex B: 5'-CAGCCGGCAAGACAACGAUCCUGUA-3'; and duplex C: 5'-CCCAGGGUCUGAUCUUGGUAGA-3') or a control nontargeted oligonucleotide (CG medium) using Lipofectamine RNAi-MAX according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Using a control oligonucleotide Alexa Fluor 488 (Invitrogen), the transfection efficiency of stealth RNAi was estimated by flow cytometry to be >85%. After 48 h, the reduction in the Arf6 protein expression and activation was determined by immunoblots, and as a control, the expression of Arf1 was checked.

Immunoblotting

Lysates were prepared before and following Fc γ R activation. Total cell extracts were prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, and a protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich) and cleared by centrifugation for 10 min at $10,000 \times g$ at 4°C. For subcellular fractions, cells were suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, containing protease inhibitors at 4°C and lysed in a Potter homogenizer. After an initial centrifugation at $800 \times g$ for 10 min at 4°C, the lysate was centrifuged at $20,000 \times g$ for 30 min at 4°C to separate soluble cytoplasmic supernatant and a membrane fraction composed of organelles and large-membrane fragments. Immunoblotting was carried out as previously described (12). Briefly, proteins were separated on 4–12% NuPAGE gradient gels in MES buffer (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose. After immunolabeling, blots were revealed using the SuperSignal West Dura or Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific). For cell lysate samples, actin served as a control for equal protein loadings. Images were acquired using a Chemi-Smart 5000 and the Chemi-Capt program (Vilber Lourmat), and protein bands were quantified using the program BioID (Vilber Lourmat). Images were then processed with Photoshop 9.

Confocal microscopy

Live cells were observed at 37°C 18–24 h after transfection in the absence or presence of IgG beads. Videos were obtained by acquiring images for GFP and phase contrast every minute for 20 min. Cells destined for immunofluorescent labeling were fixed for 10 min at 4°C with 4% paraformaldehyde in 0.125 M phosphate buffer, and for intracellular labeling, this was followed by a 10-min permeabilization step in fixative containing 0.2% Triton X-100. Samples were then blocked with 10% goat serum, and PLD was visualized using anti-HA Abs followed by goat anti-mouse Alexa Fluor 555 or 568. Images were obtained using a Zeiss LSM 510 or a Leica SP5 II inverted microscope equipped with a Plan APO oil (63 \times) immersion lens (numerical aperture = 1.4). Images were recorded with the same parameters and optimal pinhole and processed using Adobe Photoshop 9.

Using the Zeiss CLSM software 2.8, masks of double-labeled pixels were generated. The proportion of Arf6-GFP colocalized with PLD1-HA or PLD2-HA was determined in nonstimulated cells and in cells during particle ingestion using the weighted colocalization percentages generated for double-labeled pixels. Quantification of Arf6-GFP signal, or beads positive for GFP signal (MT2-GFP or Spo20p-GFP) were performed using Icy software. For each cell, a fixed region of interest of 6 pixels \times 6 pixels were randomly selected at the plasma membrane or at the periphery of

beads, and the fluorescence signal was measured and compared with the fluorescence signal obtained from five distinct region of interests of the same size randomly selected in the cytosol. Beads were considered as positive for staining if the bead fluorescence level was above 1.2-fold of averaged cytosolic signal.

Measurement of PLD activity

Forty-eight hours after siRNA transfection, RAW 264.7 macrophages (6×10^6 cells) were washed and then incubated at 37°C in the absence (resting) or presence (stimulated) of IgG-opsonized zymosan particles. Cell lysates were prepared in 600 μ l of ice-cold 50 mM Tris-HCl (pH 8) by three freeze and thaw cycles. Aliquots of the lysates (corresponding to 1×10^6 cells) were mixed with an equal amount of the Amplex Red reaction buffer (Amplex Red Phospholipase D Assay Kit; Molecular Probes), and the PLD activity was estimated after 1-h incubation at 37°C with a Mithras fluorometer (Berthold Technologies) as described previously (32). A standard curve was established with purified PLD from *Streptomyces chromofuscus* (Sigma-Aldrich), and an average activity (milliunits per milliliter) was calculated from four determinations made for each condition.

Statistical analysis

Number of experiments and repeats are indicated in figure legends. Normality of the data distribution was verified with ANOVA test, and statistical analysis was performed with *t* tests relative to the indicated control, except for Fig. 3A, for which ANOVA test was used for the analysis.

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Results

Silencing of Arf6 by RNAi reduces phagocytosis

Based on the expression of constitutively active and dominant-negative GTP binding-deficient mutants, Arf6 was the first monomeric GTPase described to play a role in phagocytosis (24–26). To investigate the downstream effector of Arf6 in phagocytosis, we decided to use an RNAi strategy to decrease the expression level of the endogenous Arf6 protein in RAW 264.7 macrophages. Three Arf6-RNAi were compared. As seen by Western blot and densitometric scan analyses (Fig. 1A), the three Arf6-RNAi specifically reduced endogenous Arf6 levels by 60–80% without affecting the expression levels of actin or the related isoform Arf1. Decrease of endogenous Arf6 in RAW 264.7 macrophages reduced phagocytosis of IgG beads by ~25% (Fig. 1B). Interestingly, Arf6 silencing inhibited phagocytosis of *E. coli* (Fig. 1B) and of non-opsonized beads (data not shown) as well. Thus, Arf6 seems to be involved in both Fc γ R-mediated and Fc γ R-independent phagocytosis. It is of note that Arf6 silencing did not alter CD64 receptor expression level (Fig. 1C), indicating that the inhibition of Fc γ R-dependent phagocytosis by reducing endogenous Arf6 is not the consequence of an eventual Fc γ R downregulation.

Arf6 is recruited to nascent phagosomes

We then investigated the subcellular localization of Arf6 in RAW 264.7 macrophages undergoing Fc γ R-mediated phagocytosis. Distribution of endogenous Arf6 was first compared with the distribution of expressed Arf6-GFP in macrophage subcellular fractions by Western blot analysis (Fig. 2A). In both resting cells and cells stimulated with IgG beads, Arf6 was found to be concentrated in the crude membrane fraction containing the plasma membrane and organelles. Of note, expressed Arf6-GFP behaved like endogenous Arf6 regarding its subcellular localization (Fig. 2A). Arf6-GFP was then used to study the distribution of Arf6 during phagocytosis in living cells by time-lapse confocal imaging (Fig. 2B). Incubation with IgG beads triggered the rapid recruitment of Arf6-GFP to the cell periphery, especially at sites of phagocytosis (arrow, Fig. 2B). Arf6-GFP was found to accumulate on pseudopods and membrane ruffles formed around the beads (Fig. 2B,

times 0–5 min). Note, however, that Arf6-GFP was not detected on fully internalized beads (Fig. 2B, times 7–20 min). Quantification of the GFP fluorescence confirmed the preferential accumulation of Arf6 at the phagocytic cup (nascent phagosomes) and, to some extent, on the plasma membrane but not on internalized beads (Fig. 2C), suggesting that Arf6 is mainly involved in the early stages of the internalization process.

Arf6 silencing reduces the amount of activated Arf6 present at the nascent phagosome

Like all GTPases, Arf6 cycles between inactive GDP-bound and active GTP-bound forms. The level of endogenous activated Arf6 in resting and IgG-stimulated RAW 264.7 macrophages was assessed by pull-down experiments using GST-GGA3 as bait for Arf6-GTP. Whereas the total level of Arf6 did not significantly change upon stimulation, the level of active Arf6 increased by more than 2.5-fold after 20 min of incubation with IgG beads (Fig. 3A). Based on the total amount of Arf6 and Arf6-GTP levels, we estimated the ratio of activated Arf6 and found an increase from 0.3% in control conditions to 0.75% following 20 min of IgG stimulation. This is probably an underestimation of the actual levels of Arf6-GTP. As the pull-down efficiency in our assay ranges from 50 to 95%, the actual Arf6-GTP levels might range from 0.3–0.6% in resting cells to 0.75–1.5% in cells stimulated for 20 min with IgG beads.

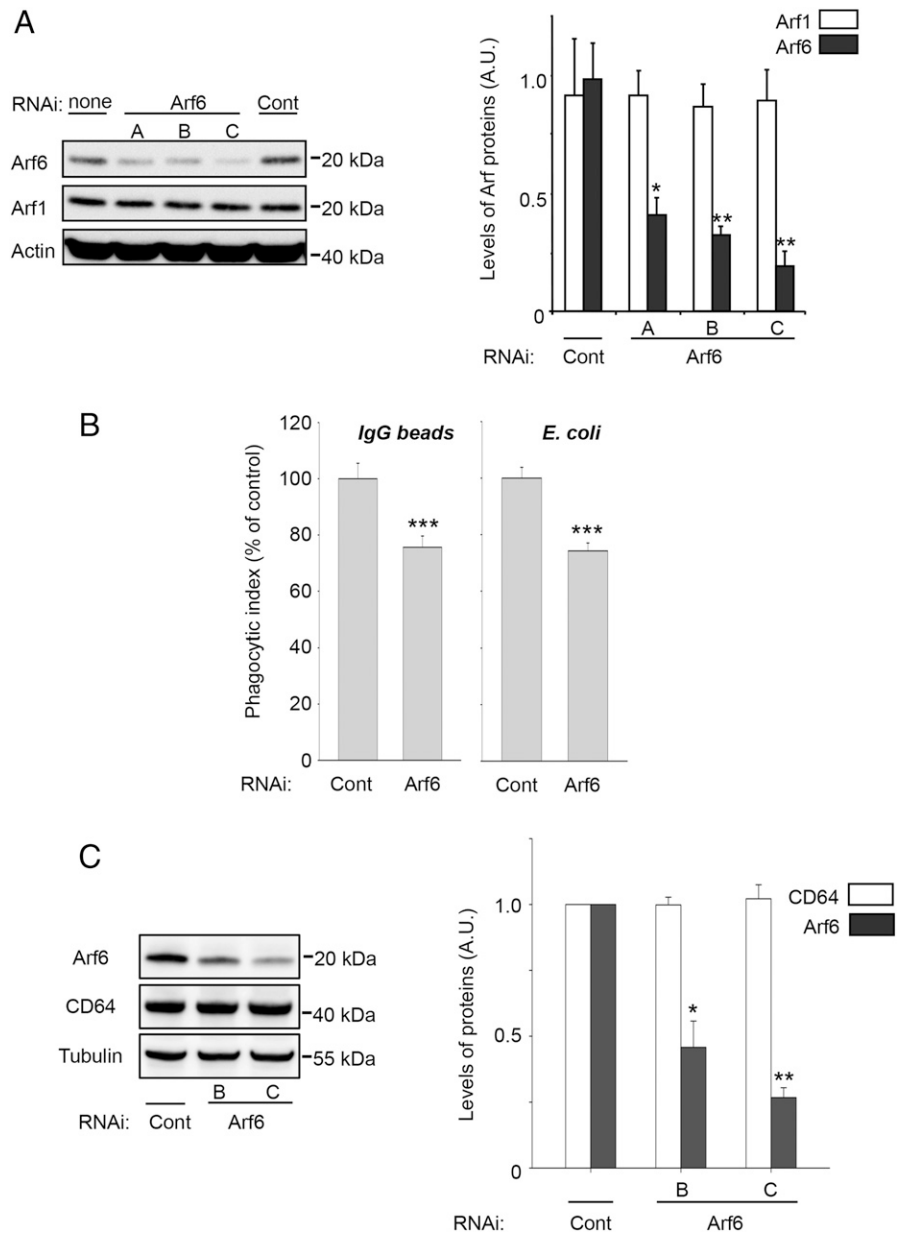
Because the amount of activated Arf6-GTP remains relatively low in many cell types (33, 34) including macrophages, the residual endogenous Arf6 expressed in Arf6-RNAi-transfected cells might be sufficient to provide levels of active Arf6 similar to that found in control cells. To probe this possibility, we used the GST-GGA3 probe to pull down the GTP-bound forms of Arf6 and Arf1 in Arf6-RNAi-expressing cells stimulated for phagocytosis. As observed for the endogenous Arf6 protein, the amount of Arf6-GTP was significantly reduced in cells expressing an Arf6-RNAi (Fig. 3B). Thus, Arf6-RNAi not only reduced the total level of endogenous Arf6 but also the amount of activated Arf6 detected in macrophages stimulated for phagocytosis. Surprisingly, Arf6-RNAi also significantly increased the level of activated Arf1 (Fig. 3B). Because Arf1 and Arf6 share several common downstream effector pathways, it is therefore quite possible that in cells expressing an Arf6-RNAi, active Arf1 may, to some extent, compensate for the reduced level of active Arf6, reducing the inhibitory impact of the Arf6-RNAi on phagocytosis.

To visualize the distribution of activated Arf6 in RAW 264.7 macrophages, MT2 fused to GFP was used as a specific sensor for Arf6-GTP because it does not recognize other members of the Arf family (28). In resting RAW 264.7 cells, the MT2-GFP sensor was found in the cytosol and the nucleus (Fig. 3C). IgG stimulation for phagocytosis led to an apparent accumulation of the MT2-GFP probe at phagocytic cups and around phagosomes (Fig. 3C). This apparent recruitment of the MT2-GFP sensor to nascent phagosomes was clearly reduced in cells expressing Arf6-RNAi (Fig. 3C). Quantification revealed that the percentage of phagosomes labeled by MT2-GFP dropped from 86 to 23% after Arf6-RNAi transfection (Fig. 3C). Altogether, these observations confirm that endogenous Arf6 is activated in stimulated macrophages and that activation occurs at the plasma membrane near phagocytic sites.

Arf6 partially colocalizes and coimmunoprecipitates with PLD1 and PLD2

PLD1 and PLD2 have been shown to be involved in Fc γ R-mediated phagocytosis (12). Because Arf6 is a well-known regulator of

FIGURE 1. Effect of Arf6 silencing on phagocytosis in RAW 264.7 macrophages. **(A)** RAW 264.7 macrophages were transfected with control RNAi (Cont) or with three different Arf6-RNAi types (A, B and C). After 48 h, transfected cells or nontransfected cells (none) were lysed. Total cell lysates were analyzed by Western blotting (20 μ g protein/well) using anti-Arf6, anti-Arf1, and anti-actin Abs. Quantification of endogenous Arf1 and Arf6 levels is shown after the correction to actin levels and normalization to cells expressing the control RNAi (Cont). **(B)** Forty-eight hours after transfection with control RNAi or Arf6-RNAi, cells were stimulated for 30 min with IgG beads or *E. coli*, and phagocytic indexes were calculated by determining the mean number of internalized beads per cell or the mean fluorescence intensity of internalized *E. coli* per cell. **(C)** Cells were transfected with the indicated siRNA and after 48 h, lysed and analyzed by Western blotting (20 μ g protein/well) using anti-Arf6, anti-CD64, and anti-tubulin Abs. Quantification of endogenous Arf6 and CD64 levels is shown after the correction to tubulin levels and normalization to cells expressing the control RNAi (Cont). Data represent mean \pm SEM. $n = 3$ independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



PLD activity in membrane trafficking (35), we first investigated whether Arf6 might be able to interact with PLD during phagocytosis. The lack of effective Abs for immunocytochemistry prompted us to use overexpressed proteins to study the distribution of Arf6, PLD1, and PLD2. In unstimulated RAW 264.7 macrophages coexpressing both Arf6-GFP and PLD1-HA, Arf6-GFP was mostly found on vesicular structures in the cytoplasm, where it partially colocalized with PLD1-HA (Fig. 4A). In contrast, when macrophages coexpressed both Arf6-GFP and PLD2-HA, Arf6-GFP was mostly found at the plasma membrane together with PLD2-HA (Fig. 4A). These observations indicate that the subcellular distribution of Arf6-GFP is affected by the overexpression of PLD1 or PLD2, suggesting that Arf6 might interact with these PLDs in RAW 264.7 cells. Stimulation with IgG beads triggered an accumulation of Arf6-GFP/PLD1-HA on nascent phagosomes, whereas Arf6-GFP/PLD2-HA was mostly detected on the plasma membrane (Fig. 4A). Quantification revealed a substantial colocalization of Arf6 with either PLD1 or PLD2 in resting conditions but also a significant increase of Arf6/PLD1 and Arf6/PLD2 colocalization in

cells undergoing phagocytosis (Fig. 4B). Note the disappearance of Arf6/PLD1-positive vesicular structures in the cytoplasm of macrophages stimulated for phagocytosis (Fig. 4A), suggesting that these structures might fuse with the plasma membrane or with the phagosomes to provide an additional membrane.

The potential interaction of Arf6 with PLD isoforms in resting and stimulated macrophages was further probed by immunoprecipitation using cells coexpressing Arf6-GFP with PLD1-HA or PLD2-HA. In control experiments performed on RAW 264.7 cell extracts, anti-HA Abs were found to precipitate around 90% of PLD1-HA or PLD2-HA, validating the efficiency of the precipitation (data not shown). We found significant levels of Arf6-GFP coimmunoprecipitating with either PLD1-HA or PLD2-HA (Fig. 5A). Coprecipitation of Arf6-GFP with PLDs appeared to be specific as no Arf6-GFP was found to precipitate with β -PIX, a protein that is not supposed to interact with either Arf6 or PLDs (Fig. 5A). PLD2 seemed to be expressed at higher levels than PLD1 as seen by the stronger HA signal, but equal levels of Arf6-GFP

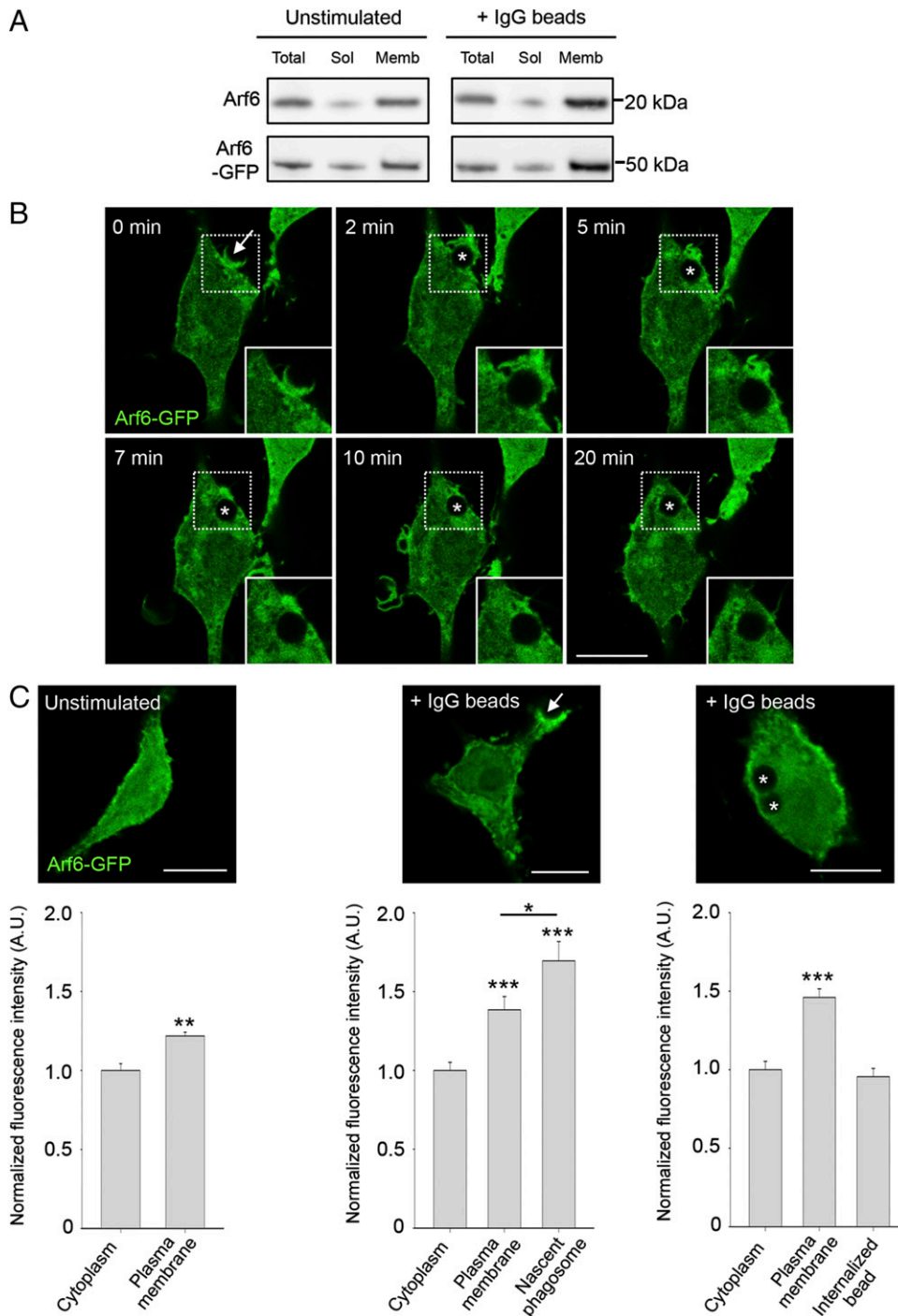


FIGURE 2. Localization of Arf6 in RAW 264.7 macrophages. **(A)** Western blots (10 μ g protein/well) showing the distribution of endogenous Arf6 and expressed Arf6-GFP in RAW 264.7 macrophages. Subcellular fractions from unstimulated and stimulated macrophages were obtained by the centrifugation of total cell lysates (Total) to separate crude membrane (Memb) and cytosolic (Sol) fractions. Results are representative of three independent experiments. **(B)** Time-lapse images of Arf6-GFP-expressing cells after addition of IgG beads. Time zero corresponds to the detection of the early phase of phagocytic cup formation around an IgG-coated bead. The arrow points to a nascent phagosome and stars indicate internalized bead. Scale bar, 10 μ m. **(C)** Representative confocal images of RAW 264.7 cells expressing Arf6-GFP in unstimulated conditions or 30 min after the addition of IgG beads to stimulate phagocytosis. The arrow points to a nascent phagosome, and stars indicate internalized beads. Scale bars, 10 μ m. Arf6-GFP signal is quantified in the cytosol, on nascent phagosomes, in cell periphery areas at the exclusion of phagosomes (plasma membrane), or around internalized beads. Twenty to twenty-five cells per condition from three independent cell cultures were analyzed. Data represent mean \pm SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

were recovered in the immunoprecipitates (Fig. 5A, 5B), suggesting that Arf6 binds more tightly to PLD1 or to a complex containing PLD1 than to PLD2. Of note, triggering phagocytosis with IgG-coated beads increased the amount of Arf6 coprecipitating with PLD1 and PLD2 but with a rather distinct time

course (Fig. 5C), suggesting different kinetics of interaction for Arf6/PLD1 and Arf6/PLD2 during phagocytosis. This observation is in line with our previous report describing the sequential activation of PLD2 followed by PLD1 in Fc γ R-mediated phagocytosis (12).

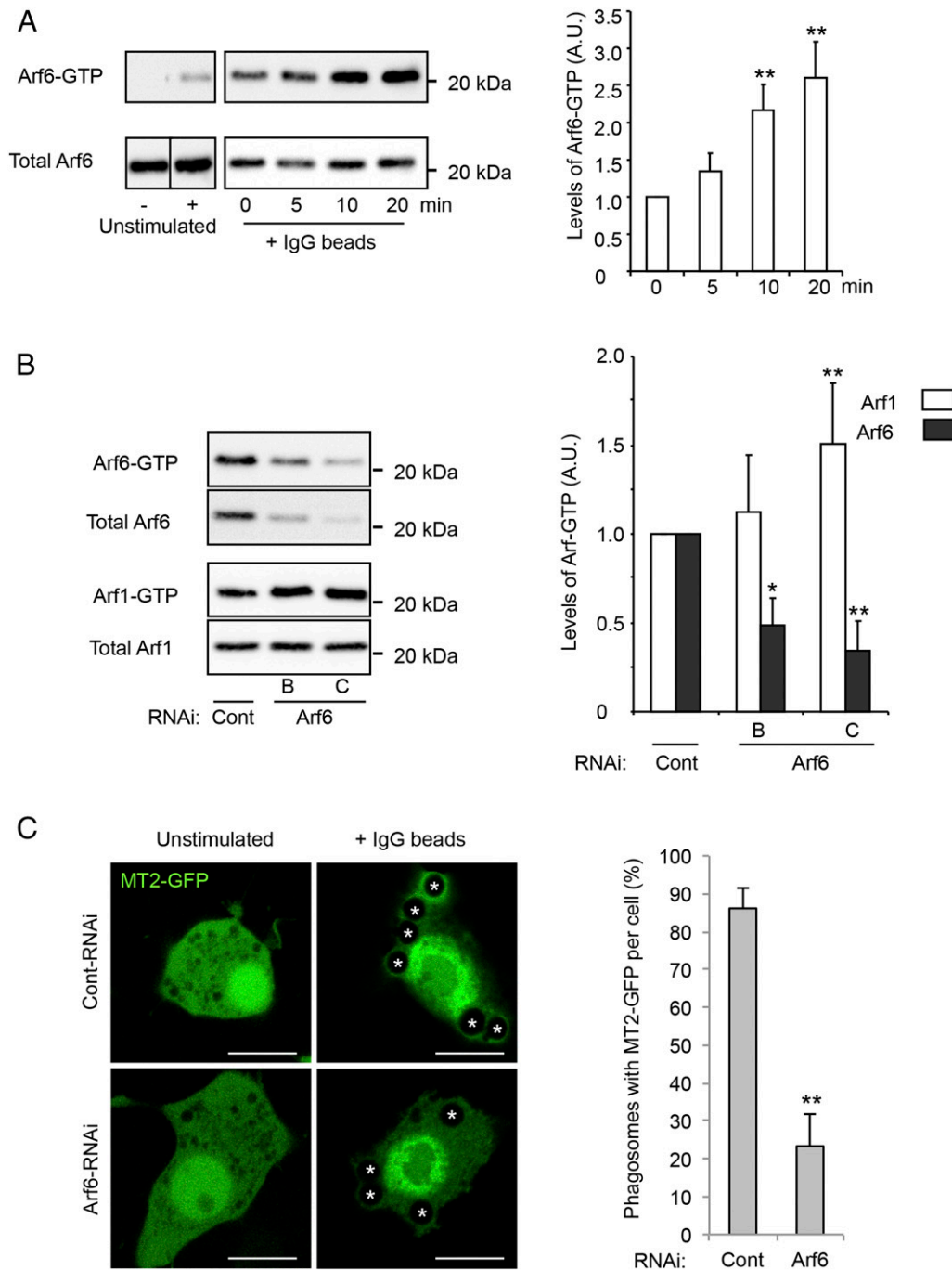


FIGURE 3. Arf6 activation during phagocytosis and effect of Arf6 silencing. **(A)** Kinetics of Arf6 activation during phagocytosis. Arf6-GTP was pulled down from 5 mg of protein lysates obtained from unstimulated or 5-, 10-, or 20-min stimulated RAW 264.7 macrophages by the addition of IgG beads. GTP-bound form of Arf6 was precipitated using the Arf-GTP-binding domain of GGA3 as bait and proteins were analyzed by Western blotting using an Ab against Arf6. Total Arf6 levels were estimated in 20 μ g aliquots of each fraction. Controls were performed by the addition of GDP (-) or GTP γ S (+) in lysates obtained from resting cells. Quantification of Arf6-GTP levels is presented after normalization to resting condition ($t = 0$ min). Values are mean \pm SD. Triplicate measurements pooled from three independent experiments with $**p < 0.01$. **(B)** RAW 264.7 macrophages expressing control RNAi (Cont) or two distinct Arf6-RNAi types (B or C) were stimulated for 5 min with IgG beads and lysed. GTP-bound forms of Arf1 and Arf6 were precipitated using the Arf-GTP-binding domain of GGA3 as bait, and proteins were analyzed by Western blotting using Abs against Arf6 and Arf1. Total Arf1 and Arf6 levels in 20 μ g of lysates were estimated by Western blotting. Quantification of Arf1-GTP and Arf6-GTP levels is presented after correction to total Arf1 and Arf6 levels, respectively, and normalization to cells expressing the control RNAi (Cont). Data represent mean \pm SD. $n = 3$ experiments. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. **(C)** RAW 264.7 macrophages were first transfected with control RNAi or Arf6-RNAi and, after 24 h, transfected with MT2-GFP to visualize the active GTP-bound form of Arf6. Unstimulated or IgG-stimulated live cells were observed by confocal microscopy. Stars indicate internalized beads. Scale bars, 10 μ m. Quantification revealing the percentage of MT2-GFP-labeled phagosomes per cell is obtained from 15 cells analyzed per conditions from two independent cell cultures. Data represent mean \pm SEM. $**p < 0.01$.

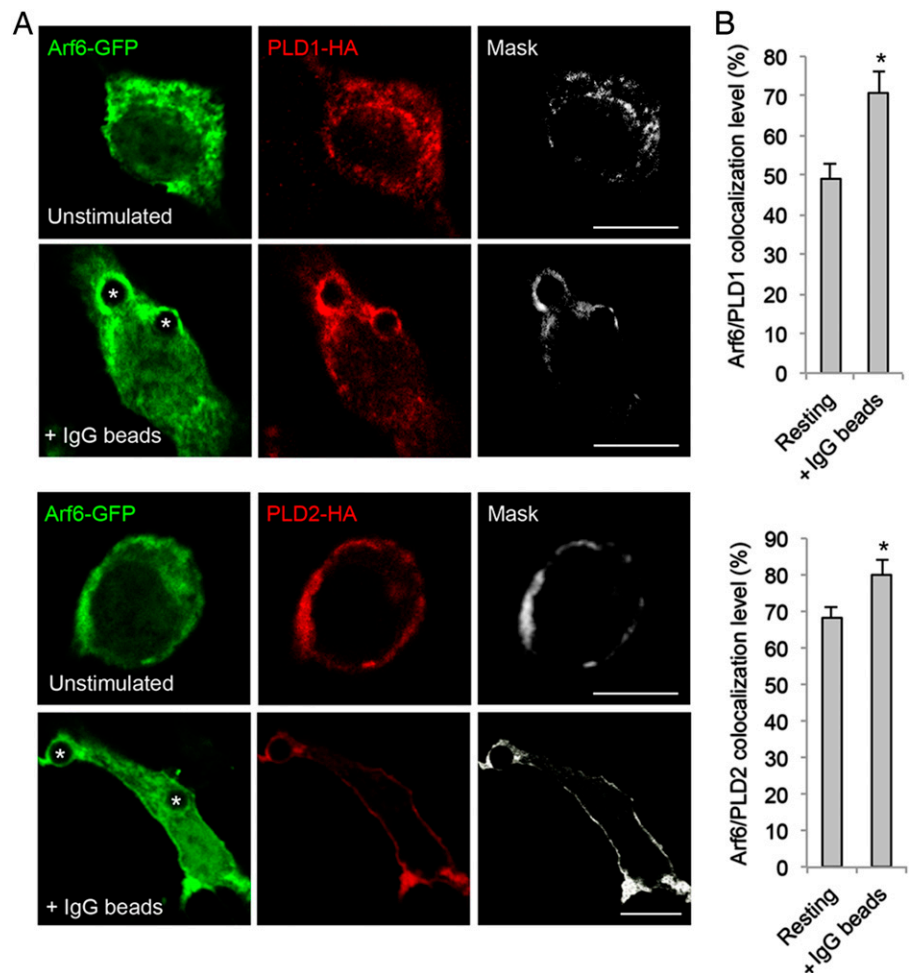


FIGURE 4. Localization of Arf6 and PLD isoforms in RAW 264.7 macrophages. **(A)** RAW 264.7 macrophages expressing Arf6-GFP and PLD1-HA or PLD2-HA maintained either unstimulated or stimulated for phagocytosis with IgG-coated beads were examined by confocal microscopy. Stars indicate internalized beads. Masks reveal the double-labeled pixels. Scale bars, 10 μ m. **(B)** Quantification of colocalization of Arf6-GFP with PLD1-HA and PLD2-HA in resting condition and after stimulation for 5 min with IgG beads. The proportion of Arf6-GFP colocalized with PLD1-HA was determined in nonstimulated cells and in cells during particle ingestion using the weighted colocalization percentages generated for double-labeled pixels. Data represent mean \pm SD. $n > 25$ cells per condition from three independent experiments. * $p < 0.05$.

Arf6 silencing reduced PLD activation and PA synthesis during phagocytosis

To explore the possibility that Arf6 regulates PLD activation during phagocytosis, we assayed PLD activity in resting or IgG-stimulated macrophages expressing Arf6-RNAi to reduce endogenous Arf6 levels. As illustrated in Fig. 6A, expression of Arf6-RNAi did not significantly modify the localization of PLD1-HA and PLD2-HA in resting or stimulated cells. However, Arf6 silencing significantly decreased the PLD activity induced by IgG stimulation of phagocytosis (Fig. 6B). Rescue experiments were performed by expressing in resting and IgG-stimulated macrophages Arf6 constructs resistant to the Arf6-RNAi. Expression of a resistant wild-type form of Arf6 largely prevented the Arf6-RNAi-mediated inhibition of PLD activity, whereas the expression of the Arf6 (N48I) mutant, unable to stimulate PLD (23), failed to rescue the PLD activity during phagocytosis (Fig. 6C). Altogether, these results strongly support a positive link between Arf6 and PLD activation during Fc γ R-mediated phagocytosis.

Activated PLD produces PA, which can be visualized using the PA-binding domain of the yeast homolog of SNAP25, Spo20p, fused to GFP (Spo20p-GFP) (13). In nonstimulated macrophages, Spo20p-GFP was mostly found in the nucleus and discretely at the plasma membrane (Fig. 7A). In contrast, in macrophages stimulated for phagocytosis, the PA sensor was actively recruited to the plasma membrane, including the phagocytic sites (Fig. 7A), in line with the idea that PLD mediates the formation of PA at the sites of particle ingestion (12, 13). To further assess the importance of Arf6 in the upstream signaling pathway of PLD, we examined the

distribution of the Spo20p-GFP PA sensor in cells expressing Arf6-RNAi. In these experiments, RAW 264.7 cells were first transfected with RNAi and then, 24 h later, transfected with the Spo20p-GFP plasmid. As shown in Fig. 7A, expression of Arf6-RNAi largely inhibited the recruitment of Spo20p-GFP to the cell periphery. The percentage of phagosomes displaying a Spo20p-GFP staining in control and Arf6-RNAi-expressing cells decreased from 83% in control cells to 30% in cells with reduced Arf6 levels (Fig. 7B). Thus, Arf6 is required for PLD activation and PA production at phagocytic sites. Finally, in line with the functional importance of PA synthesis during phagocytosis, expression of Spo20p-GFP and binding to PA potently inhibited Fc γ R-dependent phagocytosis (Fig. 7C), whereas the mutant Spo20p(L67P) that bound PA with a reduced affinity (14) failed to block phagocytosis (Fig. 7C).

Discussion

Over the last two decades, accumulating evidence has implicated the GTPase Arf6 in various membrane trafficking events, including endocrine and neuroendocrine exocytosis (23, 36, 37), endocytosis (21), and myoblast fusion (38). In these membrane trafficking processes, downstream effector(s) generally link Arf6 to lipid synthesis, mainly through the regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P₂] (37) and PA synthesis (35). Arf6 has also been involved in phagocytosis, first in macrophages (24–26, 39) and more recently in human monocytes (40). Further highlighting the contribution of Arf6 in phagocytosis, the Arf6 guanine nucleotide-exchange factor and GTPase-activating proteins,

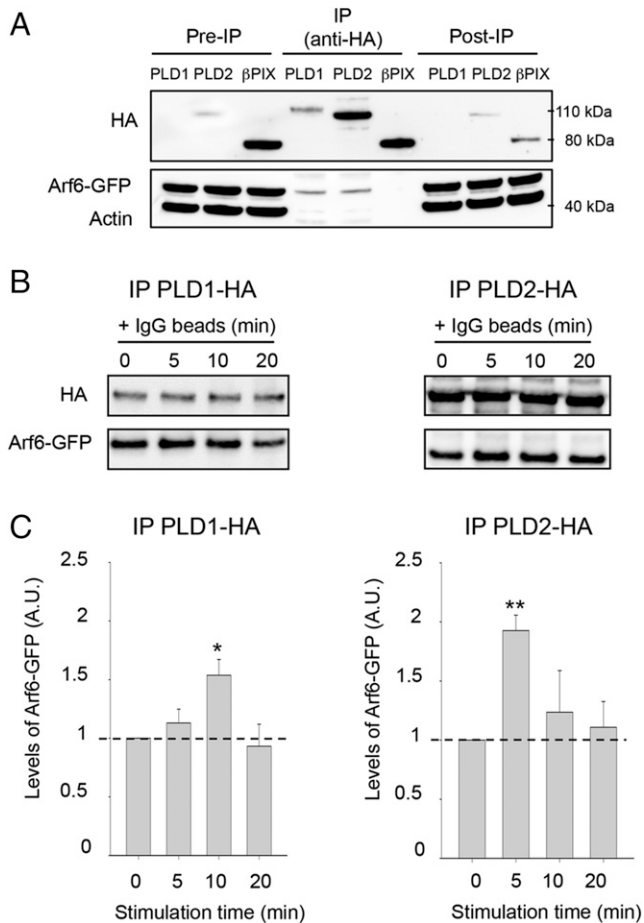


FIGURE 5. Interaction of Arf6 and PLD isoforms in RAW 264.7 macrophages. **(A)** Lysates obtained from resting RAW 264.7 macrophages expressing Arf6-GFP and PLD1-HA, PLD2-HA, or β PIX-HA were used for immunoprecipitation experiments with anti-HA Abs. Samples were analyzed by Western blot using anti-HA Abs to reveal PLD1, PLD2, or β PIX and using anti-GFP Abs to reveal Arf6. **(B)** Lysates obtained from non-stimulated or stimulated RAW 264.7 macrophages expressing Arf6-GFP and PLD1-HA or PLD2-HA were used for immunoprecipitation experiments with anti-HA Abs. Samples were analyzed by Western blotting using anti-HA Abs to reveal PLD1 or PLD2 and anti-GFP Abs to reveal Arf6. Similar results were obtained from two independent experiments. **(C)** Quantification of Arf6-GFP levels that coimmunoprecipitated with PLD1-HA and PLD2-HA at different stimulation time after normalization to unstimulated cells (time = 0). Data represent mean \pm SEM. $n = 4$ independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Arf-GEP100/BRAG2 and PAG3, have been identified as regulators of phagocytosis (41, 42). Yet, despite this set of findings, our understanding of the role of Arf6 in phagocytosis is still limited and awaits the identification of its downstream effectors. The present report provides evidence that IgG-stimulated phagocytosis leads to the activation of Arf6, its recruitment to the phagocytic cup, and the subsequent stimulation of PLD to produce PA at the phagosome. Arf6 silencing was found to inhibit phagocytosis of opsonized and nonopsonized beads as well as bacteria, suggesting that the Arf6-regulated PLD pathway described in this study in detail for Fc γ R-dependent phagocytosis might be generalized for different types of phagocytic pathways.

We have previously described a positive effect of Ral A on phagocytosis that could be explained in part by its interaction with PLD, which itself positively regulates phagocytosis (31). A similar relationship between the Ral GTPases and PLD has also been described in exocytosis (43), receptor endocytosis (44), and neurite

branching (45). In this study, we observed that Arf6 localizes with PLD1 and PLD2 on nascent phagosomes and interacts with both PLD isoforms in resting and stimulated macrophages as seen by colocalization and immunoprecipitation experiments. Noteworthy, Ral A was also found to coimmunoprecipitate with PLD1 and PLD2 but only in cells undergoing phagocytosis (31). At this stage, it is not possible to state whether the interactions of Arf6 and Ral A with PLDs are direct or indirect, but the persistent coimmunoprecipitation of Arf6 with PLDs compared with the activity-dependent coimmunoprecipitation of Ral A with PLDs, suggests that in macrophages, the regulation of PLD activity and PA production by these two GTPases involves different modalities. Interestingly, a Ral-Arf6 cross-talk has been recently described in exocyst trafficking and other Ral functions in cells in which active Ral uses a Ral-RalBP1-ARNO-Arf6 pathway to mediate Arf6 activation (46). Thus, a possible explanation for our observations would be that Arf6 and PLD are part of a common complex in resting macrophages and that IgG binding to Fc γ R mediates activation and recruitment of Ral A to Arf6/PLD complex to trigger Arf6 activation and subsequent PLD stimulation. Regarding the production of PA, it was recently reported that macrophages and immature dendritic cells display elevated basal plasma membrane levels of PA required for immunosurveillance that appear to be generated through the phosphorylation of DAG (15). Thus, macrophages seem to control intracellular PA levels through several alternative pathways, highlighting the central role of this lipid in the various immune functions of macrophages.

Determining the cellular processes implicating Arf6-mediated PLD activation in the course of phagocytosis remains an important unresolved issue. Our observation that the expression of the PA sensor Spo20p-GFP decreases IgG beads internalization supports the idea that PA synthesis at the phagocytic cup contributes to efficient phagocytosis. As lipids and lipid-anchored proteins coordinate spatial and temporal patterns within the nascent phagosomal membrane (47), the modulation of PA production by PLD at phagocytic sites (12) may actually contribute to the organization of the phagocytic cup. For instance, PA can be converted into other bioactive lipids, like diacylglycerol or PtdIns(4,5)P₂, both of which are implicated in the phagocytic machinery (10, 48–50). Alternatively, PA may act by activating or recruiting regulators of actin cytoskeleton implicated in membrane trafficking (51). In line, it was recently reported in PLD knockout mice that macrophages present disorganized phagocytic cups with abnormal F-actin structures (17). PA could also participate in the fusion process either directly as its small polar head promotes negative membrane curvatures favoring membrane hemifusion (36) or indirectly by serving as a lipid anchor for proteins involved in the fusion process as, for example, Rab11FIP on recycling endosomes (52) or Q-SNARE Syntaxin1A (53) at the plasma membrane. The fact that Arf6 is recruited during phagosome formation and thereafter dissociates from internalized phagosomes supports the idea that Arf6 might play its role in the early phases of the phagocytic process.

We show in this study that Arf6-RNAi only moderately inhibited phagocytic activity and had much less effect than the expression of Arf6 (T27N), a dominant-negative form of Arf6 (25). In fact, in contrast to Arf6-RNAi (36), expression of Arf6 (T27N) also strongly affects the dynamics of the recycling endosomal compartment and PtdIns(4,5)P₂ biosynthesis (54). It is thus likely that the strong effect on phagocytosis observed upon Arf6 (T27N) expression is the consequence of a major alteration of PtdIns(4,5)P₂ biosynthesis, in addition to reduced PLD activation. Altogether, these observations suggest that either Arf6 activation of PLD plays only a modulatory role in phagocytosis or the amount of Arf6 remaining in cells expressing Arf6-RNAi is enough to sustain a large part of Arf6

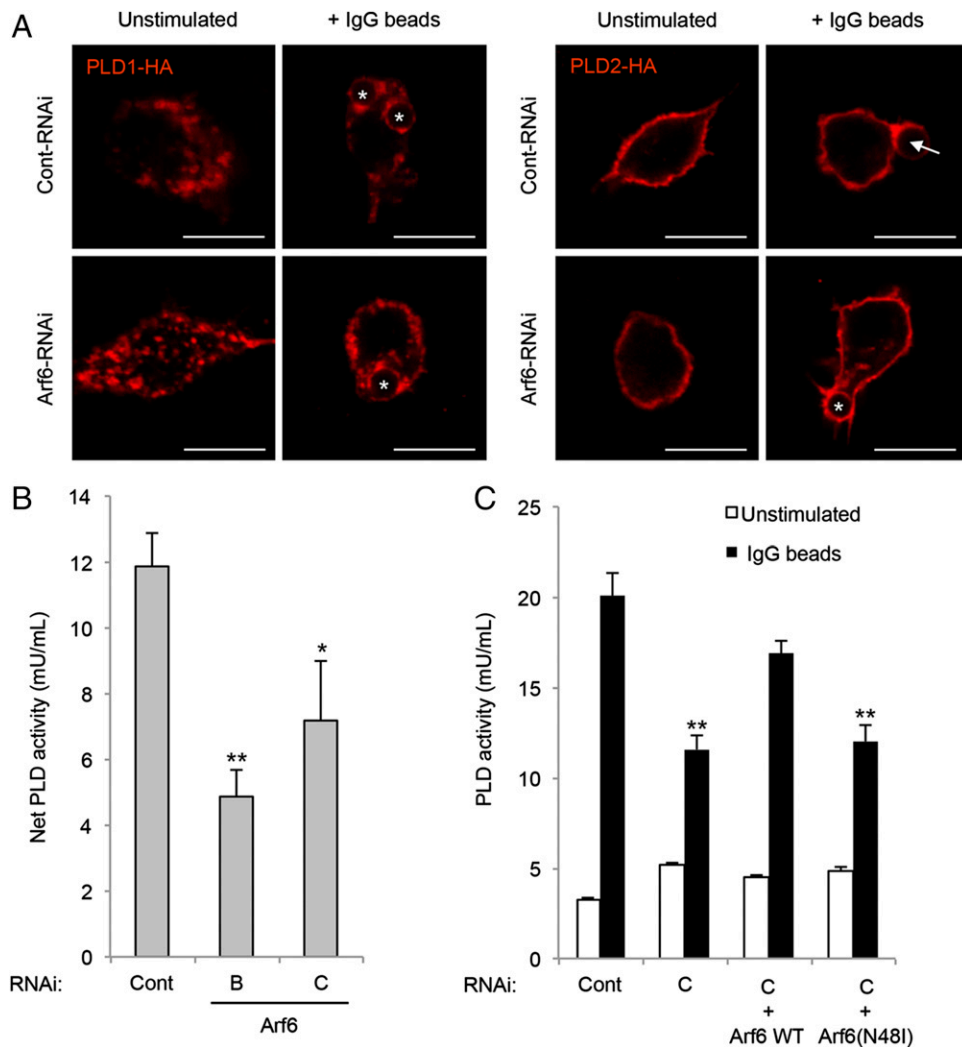


FIGURE 6. Effect of Arf6 silencing on PLD localization and activity during phagocytosis. **(A)** RAW 264.7 macrophages were transfected with control RNAi or Arf6-RNAi type C and, after 24 h, transfected with PLD1-HA or PLD2-HA. Twenty-four hours later, unstimulated or IgG-stimulated cells were fixed and stained before observation by confocal microscopy. Arrow indicates a nascent phagosome, and stars indicate internalized beads. Scale bars, 10 μ m. **(B)** Forty-eight hours after transfection with a nontargeted RNAi duplex (control) or Arf6-RNAi (types B or C), macrophages in suspension were maintained under resting conditions or incubated in the presence of IgG-coated zymosan particles for 10 min. Cell lysates were prepared and assayed for PLD activity. The net IgG-stimulated PLD activity was obtained by subtracting the PLD activity in resting conditions from that of IgG-treated conditions. Data are presented as mean \pm SD. $n = 4$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Similar results were obtained on five different cell preparations. **(C)** RAW 264.7 macrophages were transfected with control RNAi or Arf6-RNAi type C and, after 24 h, transfected with siRNA-resistant Arf6 wild-type or Arf6(N481) constructs. Twenty-four hours later, macrophages in suspension were maintained under resting conditions or incubated in the presence of IgG-coated zymosan particles for 10 min before PLD activity determination. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 8$. ** $p < 0.01$.

function in phagocytosis. Alternatively, upregulation of related GTPases, which can activate PLD, may compensate for the reduction of Arf6 activity. Indeed, we observed that Arf1 activation significantly increased after Arf6-RNAi treatment (Fig. 3B). PLDs are modular enzymes that can be activated by a variety of GTPases, including Arfs, Rals, and Rac (27). Interestingly, Arf6 and Rac have been shown to transiently form a complex that is dependent on their activation status and their expression levels (55), highlighting the complexity of interactions between the various GTPases regarding their effector pathways. Both Arf6 and Rac have been shown to be involved in membrane ruffling in macrophages (56), and Rac is implicated in phagosome formation (57, 58). Another possibility, although not exclusively, is that the implication of the Arf6–PLD pathway may depend on the size and number of particles to be internalized because phagosome formation has been proposed to require more or less focal exocytosis of internal membranes (7). It is indeed likely that the type and level of PA

required at phagocytic sites may differ for different phagocytic processes. For instance, we have recently shown that frustrated phagocytosis induces a nearly 2-fold increase in PA levels at the plasma membrane occurring only partly at the expense of the endoplasmic reticulum pool of PA (14). Lipidomic analysis revealed that more than 40 different PA species were detected in different intracellular membrane compartments in RAW 264.7 macrophages, suggesting that these different forms of PA contribute differently to phagocytosis (14). In this direction, it is likely that different regulatory pathways involving various GTPases actually contribute to the synthesis of different PA species required for phagocytosis. The recent development of novel PA sensors displaying some preference for specific PA species, depending on the lipid environment and the subcellular localization (14), will undoubtedly prove to be useful to investigate this possibility. Finally, Arf6 promotes not only PA but also PtdIns(4,5)P₂ production for autophagosome formation (59), further underlining the

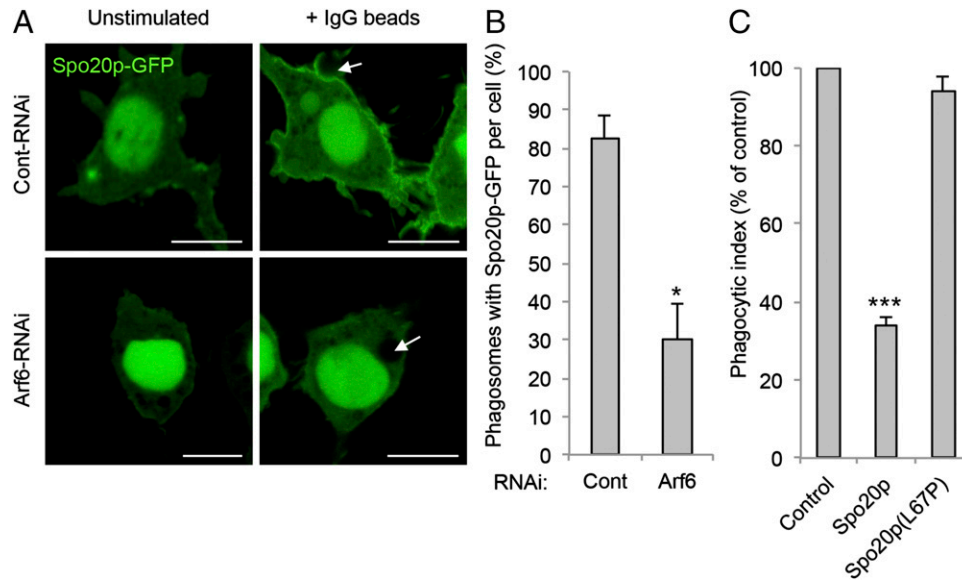


FIGURE 7. Effect of Arf6 silencing on PA synthesis during phagocytosis. **(A)** RAW 264.7 macrophages were transfected with control RNAi or Arf6-RNAi type C and, after 24 h, transfected with Spo20p-GFP to visualize PA. Resting or IgG-stimulated live cells were observed by confocal microscopy. Arrow indicates nascent phagosomes, and star indicates internalized bead. Scale bars, 10 μ m. **(B)** Quantification of the percentage of Spo20p-GFP-labeled phagosomes per cell obtained from 15 cells analyzed per conditions from two independent cell cultures. Data represent mean \pm SEM. * p < 0.05. **(C)** Cells expressing GFP (Control), Spo20p-GFP, or the mutated form Spo20p (L67L) were stimulated for 10 min with IgG beads, and phagocytic indexes were calculated by determining the mean number of internalized beads per cell. Data represent mean \pm SD. n = 4 independent experiments. *** p < 0.001.

complexity and interconnections of Arf6 and lipid-modifying enzymes in the dynamics of membrane remodeling.

To conclude, together with several other lipids (60), local PA production appears to be essential for at least an important step of the life cycle of phagosomes (61). The exquisite dynamics of all these key lipids remain, however, to be precisely studied. The present results indicate that Arf6 is implicated in the regulation of phagocytosis in part by controlling PLD activation at the nascent phagosome, and we propose that Arf6 may serve to link the PA production to phagosome formation.

Acknowledgments

We thank the microscopy facilities of Plateforme Imagerie In Vitro of the Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Swanson, J. A., and A. D. Hoppe. 2004. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 76: 1093–1103.
- Vieira, O. V., R. J. Botelho, and S. Grinstein. 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366: 689–704.
- Holevinsky, K. O., and D. J. Nelson. 1998. Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys. J.* 75: 2577–2586.
- Swanson, J. A., M. T. Johnson, K. Beningo, P. Post, M. Mooseker, and N. Araki. 1999. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J. Cell Sci.* 112: 307–316.
- Huynh, K. K., J. G. Kay, J. L. Stow, and S. Grinstein. 2007. Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology (Bethesda)* 22: 366–372.
- Czibener, C., N. M. Sherer, S. M. Becker, M. Pypaert, E. Hui, E. R. Chapman, W. Mothes, and N. W. Andrews. 2006. Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *J. Cell Biol.* 174: 997–1007.
- Becker, T., A. Volchuk, and J. E. Rothman. 2005. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 4022–4026.
- Bajno, L., X.-R. Peng, A. D. Schreiber, H.-P. Moore, W. S. Trimble, and S. Grinstein. 2000. Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J. Cell Biol.* 149: 697–706.
- Braun, V., V. Fraisier, G. Raposo, I. Hurbain, J.-B. Sibarita, P. Chavrier, T. Galli, and F. Niedergang. 2004. TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonized particles in macrophages. *EMBO J.* 23: 4166–4176.
- Lennartz, M. R. 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 415–430.
- Yeung, T., and S. Grinstein. 2007. Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol. Rev.* 219: 17–36.
- Corrotte, M., S. Chasserot-Golaz, P. Huang, G. Du, N. T. Ktistakis, M. A. Frohman, N. Vitale, M.-F. Bader, and N. J. Grant. 2006. Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* 7: 365–377.
- Kassas, N., P. Tryoen-Tóth, M. Corrotte, T. Thahouly, M. F. Bader, N. J. Grant, and N. Vitale. 2012. Genetically encoded probes for phosphatidic acid. *Methods Cell Biol.* 108: 445–459.
- Kassas, N., E. Tanguy, T. Thahouly, L. Fouillen, D. Heintz, S. Chasserot-Golaz, M.-F. Bader, N. J. Grant, and N. Vitale. 2017. Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 292: 4266–4279.
- Bohdanowicz, M., D. Schlam, M. Hermansson, D. Rizzuti, G. D. Fairn, T. Ueyama, P. Somerharju, G. Du, and S. Grinstein. 2013. Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Mol. Biol. Cell* 24: 1700–1712, S1–S7.
- Kusner, D. J., C. F. Hall, and S. Jackson. 1999. Fc γ receptor-mediated activation of phospholipase D regulates macrophage phagocytosis of IgG-opsonized particles. *J. Immunol.* 162: 2266–2274.
- Ali, W. H., Q. Chen, K. E. Delgiorno, W. Su, J. C. Hall, T. Hongu, H. Tian, Y. Kanaho, G. Di Paolo, H. C. Crawford, and M. A. Frohman. 2013. Deficiencies of the lipid-signaling enzymes phospholipase D1 and D2 alter cytoskeletal organization, macrophage phagocytosis, and cytokine-stimulated neutrophil recruitment. *PLoS One* 8: e55325.
- Choi, W. S., Y. M. Kim, C. Combs, M. A. Frohman, and M. A. Beaven. 2002. Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. *J. Immunol.* 168: 5682–5689.
- Peng, Z., and M. A. Beaven. 2005. An essential role for phospholipase D in the activation of protein kinase C and degranulation in mast cells. *J. Immunol.* 174: 5201–5208.
- Zhu, M., J. Zou, T. Li, S. A. O'Brien, Y. Zhang, S. Ogen, and W. Zhang. 2015. Differential roles of phospholipase D proteins in Fc ϵ R1-mediated signaling and mast cell function. *J. Immunol.* 195: 4492–4502.
- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 347–358.
- Radhakrishna, H., and J. G. Donaldson. 1997. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* 139: 49–61.
- Vitale, N., S. Chasserot-Golaz, Y. Bailly, N. Morinaga, M. A. Frohman, and M.-F. Bader. 2002. Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 159: 79–89.
- Zhang, Q., D. Cox, C.-C. Tseng, J. G. Donaldson, and S. Greenberg. 1998. A requirement for ARF6 in Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* 273: 19977–19981.

25. Niedergang, F., E. Colucci-Guyon, T. Dubois, G. Raposo, and P. Chavrier. 2003. ADP-ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J. Cell Biol.* 161: 1143–1150.
26. Beemiller, P., A. D. Hoppe, and J. A. Swanson. 2006. A phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signal transition regulates ARF1 and ARF6 during Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *PLoS Biol.* 4: e162.
27. Exton, J. H. 2002. Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett.* 531: 58–61.
28. Béglé, A., P. Tryoen-Tóth, J. de Barry, M.-F. Bader, and N. Vitale. 2009. ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 284: 4836–4845.
29. Vitale, N., A.-S. Caumont, S. Chasserot-Golaz, G. Du, S. Wu, V. A. Sciorra, A. J. Morris, M. A. Frohman, and M.-F. Bader. 2001. Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 20: 2424–2434.
30. Zeniou-Meyer, M., N. Zabari, U. Ashery, S. Chasserot-Golaz, A.-M. Haerberlé, V. Demais, Y. Bailly, I. Gottfried, H. Nakanishi, A. M. Neiman, et al. 2007. Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* 282: 21746–21757.
31. Corrotte, M., A. P. Nguyen, M. L. Harlay, N. Vitale, M.-F. Bader, and N. J. Grant. 2010. Ral isoforms are implicated in Fc γ R-mediated phagocytosis: activation of phospholipase D by RalA. *J. Immunol.* 185: 2942–2950.
32. Ammar, M. R., T. Thahouly, A. Hanauer, D. Stegner, B. Nieswandt, and N. Vitale. 2015. PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Sci. Rep.* 5: 14778.
33. Lahuna, O., M. Quellarì, C. Achard, S. Nola, G. Méduri, C. Navarro, N. Vitale, J.-P. Borg, and M. Misrahi. 2005. Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-betaPIX-GIT1-ARF6 pathway. *EMBO J.* 24: 1364–1374.
34. Arvanitis, D. N., A. Béhar, P. Tryoen-Tóth, J. O. Bush, T. Jungas, N. Vitale, and A. Davy. 2013. Ephrin B1 maintains apical adhesion of neural progenitors. *Development* 140: 2082–2092.
35. Massenburg, D., J. S. Han, M. Liyanage, W. A. Patton, S. G. Rhee, J. Moss, and M. Vaughan. 1994. Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11718–11722.
36. Bader, M.-F., and N. Vitale. 2009. Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 936–941.
37. Lawrence, J. T. R., and M. J. Birnbaum. 2003. ADP-ribosylation factor 6 regulates insulin secretion through plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 13320–13325.
38. Bach, A.-S., S. Enjalbert, F. Comunale, S. Bodin, N. Vitale, S. Charrasse, and C. Gauthier-Rouvière. 2010. ADP-ribosylation factor 6 regulates mammalian myoblast fusion through phospholipase D1 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling pathways. *Mol. Biol. Cell* 21: 2412–2424.
39. Egami, Y., M. Fujii, K. Kawai, Y. Ishikawa, M. Fukuda, and N. Araki. 2015. Activation-inactivation cycling of Rab35 and ARF6 is required for phagocytosis of zymosan in RAW264 macrophages. *J. Immunol. Res.* 2015: 429439.
40. Humphreys, D., V. Singh, and V. Koronakis. 2016. Inhibition of WAVE regulatory complex activation by a bacterial virulence effector counteracts pathogen phagocytosis. *Cell Rep.* 17: 697–707.
41. Someya, A., J. Moss, and I. Nagaoka. 2010. The guanine nucleotide exchange protein for ADP-ribosylation factor 6, ARF-GEP100/BRAG2, regulates phagocytosis of monocytic phagocytes in an ARF6-dependent process. *J. Biol. Chem.* 285: 30698–30707.
42. Uchida, H., A. Kondo, Y. Yoshimura, Y. Mazaki, and H. Sabe. 2001. PAG3/Papalpa/KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis of macrophages. *J. Exp. Med.* 193: 955–966.
43. Vitale, N., J. Mawet, J. Camonis, R. Regazzi, M.-F. Bader, and S. Chasserot-Golaz. 2005. The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* 280: 29921–29928.
44. Bhattacharya, M., A. V. Babwah, C. Godin, P. H. Anborgh, L. B. Dale, M. O. Poulter, and S. S. G. Ferguson. 2004. Ral and phospholipase D2-dependent pathway for constitutive metabotropic glutamate receptor endocytosis. *J. Neurosci.* 24: 8752–8761.
45. Lalli, G., and A. Hall. 2005. Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J. Cell Biol.* 171: 857–869.
46. Pawar, A., J. A. Meier, A. Dasgupta, N. Diwanji, N. Deshpande, K. Saxena, N. Buwa, S. Inchanalkar, M. A. Schwartz, and N. Balasubramanian. 2016. Ral-Arf6 crosstalk regulates Ral dependent exocyst trafficking and anchorage independent growth signalling. *Cell. Signal.* 28: 1225–1236.
47. Swanson, J. A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 639–649.
48. Botelho, R. J., R. E. Harrison, J. C. Stone, J. F. Hancock, M. R. Philips, J. Jongstra-Bilen, D. Mason, J. Plumb, M. R. Gold, and S. Grinstein. 2009. Localized diacylglycerol-dependent stimulation of Ras and Rap1 during phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 284: 28522–28532.
49. Scott, C. C., W. Dobson, R. J. Botelho, N. Coady-Osberg, P. Chavrier, D. A. Knecht, C. Heath, P. Stahl, and S. Grinstein. 2005. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J. Cell Biol.* 169: 139–149.
50. Swanson, J. A. 2014. Phosphoinositides and engulfment. *Cell. Microbiol.* 16: 1473–1483.
51. Ktistakis, N. T., C. Delon, M. Manifava, E. Wood, I. Ganley, and J. M. Sugars. 2003. Phospholipase D1 and potential targets of its hydrolysis product, phosphatidic acid. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 94–97.
52. Lindsay, A. J., and M. W. McCaffrey. 2002. Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277: 27193–27199.
53. Lam, A. D., P. Tryoen-Toth, B. Tsai, N. Vitale, and E. L. Stuenkel. 2008. SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol. Biol. Cell* 19: 485–497.
54. Brown, F. D., A. L. Rozelle, H. L. Yin, T. Balla, and J. G. Donaldson. 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J. Cell Biol.* 154: 1007–1017.
55. Cotton, M., P.-L. Boulay, T. Houndolo, N. Vitale, J. A. Pitcher, and A. Claing. 2007. Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol. Biol. Cell* 18: 501–511.
56. Zhang, Q., J. Calafat, H. Janssen, and S. Greenberg. 1999. ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol. Cell Biol.* 19: 8158–8168.
57. Hoppe, A. D., and J. A. Swanson. 2004. Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* 15: 3509–3519.
58. Cougoule, C., S. Hoshino, A. Dart, J. Lim, and E. Caron. 2006. Dissociation of recruitment and activation of the small G-protein Rac during Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 281: 8756–8764.
59. Moreau, K., B. Ravikumar, C. Puri, and D. C. Rubinsztein. 2012. Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *J. Cell Biol.* 196: 483–496.
60. Ostrowski, P. P., S. Grinstein, and S. A. Freeman. 2016. Diffusion barriers, mechanical forces, and the biophysics of phagocytosis. *Dev. Cell* 38: 135–146.
61. Levin, R., S. Grinstein, and J. Canton. 2016. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol. Rev.* 273: 156–179.

CHAPITRE II : Implication des PLD et du PA au cours de l'exocytose régulée

- Introduction -

I. Le processus d'exocytose régulée

A. *Définition et rôles physiologiques de l'exocytose*

L'exocytose est un processus biologique fondamental, utilisé par les cellules pour assurer la fusion entre une vésicule et la membrane plasmique. Il est retrouvé de façon universelle chez les eucaryotes, et les mécanismes moléculaires mis en jeu sont hautement conservés d'une espèce à l'autre (Ferro-Novick et Jahn, 1994). Ce processus constitue la phase finale de la sécrétion, permettant notamment l'apport de constituants membranaires ou la libération du contenu des vésicules dans le milieu extracellulaire. De cette façon, l'exocytose assure d'une part le maintien de l'intégrité des cellules et l'homéostasie membranaire, et d'autre part la communication cellulaire, *via* la libération de messagers dans le milieu extracellulaire.

On distingue par conséquent deux types d'exocytose chez les organismes pluricellulaires : l'exocytose constitutive et l'exocytose régulée. Quel que soit le type d'exocytose, celle-ci fait intervenir des vésicules ou granules de sécrétion formés au niveau de l'appareil de Golgi et qui sont acheminés vers la membrane plasmique. L'exocytose constitutive permet la libération des composants de la matrice extracellulaire, ou simplement la livraison de protéines ou de lipides nouvellement synthétisés qui seront incorporés dans la membrane plasmique au moment de la fusion de la vésicule de transport. Elle assure ainsi la croissance, l'approvisionnement et le renouvellement des composants membranaires. L'exocytose constitutive a lieu dans toutes les cellules et en permanence. L'exocytose régulée, en revanche, nécessite la réception par une cellule spécialisée d'un signal déclencheur, entraînant généralement la libération de molécules informatives dans le milieu extracellulaire.

B. *L'exocytose régulée, une spécificité des cellules sécrétrices*

En plus de la fonction ubiquitaire assurée par l'exocytose constitutive, des cellules dites sécrétrices possèdent un système hautement contrôlé appelé exocytose régulée, qui permet une réponse appropriée à une demande de l'organisme (Burgoyne et Morgan, 2003). Classiquement, ce type d'exocytose est considéré comme crucial pour la communication entre les cellules sécrétrices et le reste de l'organisme. De cette façon, des cellules telles que les neurones ou les cellules neuroendocrines libèrent des neurotransmetteurs, des neuropeptides ou encore des hormones, qui vont agir spécifiquement au niveau d'organes cibles. L'exocytose régulée est ainsi

au cœur de fonctions physiologiques essentielles comme la neurotransmission et la sécrétion endocrine. Néanmoins, ce processus peut également être utilisé par la cellule de façon « non sécrétrice » *via* l'exocytose focale, qui fournit un apport de membrane de façon contrôlée et lui permet d'augmenter sa surface cellulaire. De cette façon, l'exocytose régulée participe alors à divers processus tels que la phagocytose, la migration ou la formation des neurites. Enfin, son dernier rôle est de médier l'insertion dans la membrane plasmique de récepteurs, de transporteurs ou de canaux, pour induire la potentialisation d'une réponse cellulaire donnée. Nous pouvons citer comme exemple l'apport du transporteur du glucose GLUT4 dans les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques (Chieregatti et Meldolesi, 2005).

Les médiateurs protéiques destinés à être sécrétés dans la voie régulée sont synthétisés au niveau du RE, puis acheminés au niveau de l'appareil de Golgi. Ils sont ensuite empaquetés dans des granules de sécrétion formés par bourgeonnement au niveau du TGN. Les granules nouvellement formés subissent différentes étapes de maturation tout en étant acheminés vers la périphérie cellulaire, où ils se répartissent en différentes populations. Une fois recrutés à la membrane plasmique, plusieurs étapes successives permettront aux granules d'être prêts à fusionner (**figure 33**). Le processus d'exocytose régulée est déclenché suite à la réception par la cellule d'un signal extracellulaire, entraînant une élévation de la concentration intracellulaire en calcium. Ce dernier initie des cascades de signalisation moléculaires qui permettent *in fine* la fusion des membranes vésiculaire et plasmique, et ainsi la libération du contenu des granules de sécrétion dans le milieu extracellulaire. L'exocytose régulée peut être subdivisée en au moins 4 étapes successives : le recrutement des vésicules ou granules à proximité du site d'exocytose, leur arrimage à la membrane plasmique, l'amorçage qui correspond à la préparation à la fusion et enfin la fusion proprement dite (Stojilkovic, 2005). L'exocytose régulée est un processus complexe qui requiert notamment un remodelage important du cytosquelette d'actine, une réorganisation spécifique des lipides et l'assemblage de multiples éléments protéiques conduisant à l'arrimage puis à la fusion des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique.

C. Modèles d'étude de l'exocytose régulée

La sécrétion régulée est un phénomène répandu dans de très nombreux types cellulaires, ce qui permet de l'étudier sur des modèles relativement variés. Au niveau des organismes unicellulaires, on retrouve la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que les levures ne possèdent pas à proprement parler une exocytose régulée classique, cet organisme contribue de façon significative à la compréhension des mécanismes du transport vésiculaire. Il présente l'avantage de pouvoir être modifié génétiquement de façon relativement aisée. De plus, les résultats obtenus chez la levure sont régulièrement transposables à d'autres organismes, notamment parce que de nombreux gènes sont conservés de la levure jusqu'aux eucaryotes supérieurs (Ferro-Novick et Jahn, 1994 ; Brennwald et Rossi, 2007). Dans les organismes pluricellulaires, l'exocytose régulée

a lieu dans des cellules spécialisées qui sécrètent de manière exocrine ou endocrine. La machinerie moléculaire de l'exocytose est relativement bien conservée d'un type cellulaire à l'autre, incluant en particulier les protéines SNARE formant un complexe multiprotéique indispensable à l'exocytose régulée. On retrouve cependant des variations en termes de cinétique et de mode de régulation de l'exocytose entre les types cellulaires et les organismes, probablement au vu de la diversité des fonctions physiologiques impliquées.

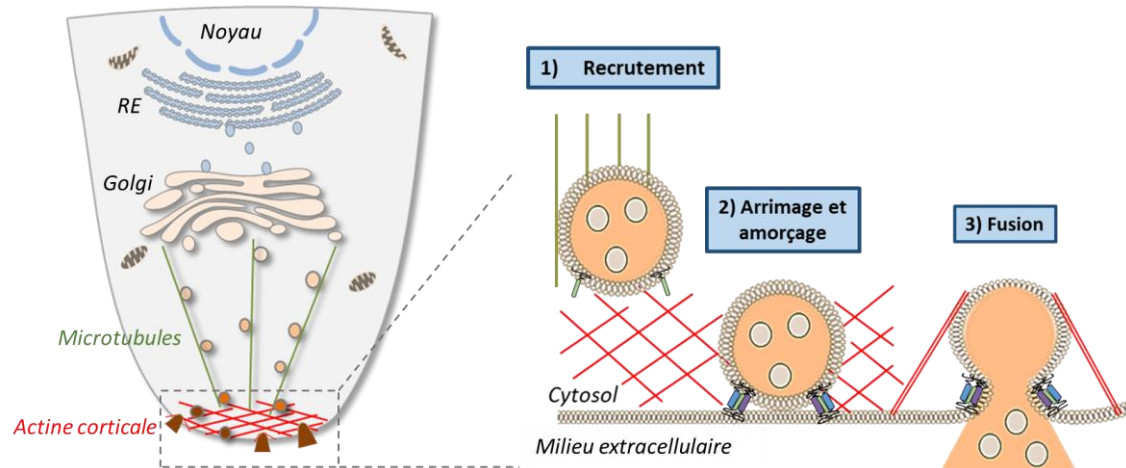


Figure 33 : La sécrétion et les différentes étapes de l'exocytose régulée par le calcium

La sécrétion débute par la formation de vésicules par bourgeonnement à partir de l'appareil de Golgi. Les vésicules sont ensuite transportées par les microtubules et l'actine vers la membrane plasmique, où auront lieu les étapes de l'exocytose, déclenchée par l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire.

Parmi les cellules endocrines, les cellules β pancréatiques des îlots de Langerhans font le sujet de très nombreuses études sur la régulation de la libération d'insuline, au vu de la prévalence du diabète de type 2, caractérisé par un défaut de sécrétion de ces cellules. La sécrétion d'insuline est étudiée sur les cellules en culture primaire mais aussi sur les lignées HIT ou MIN 6. On retrouve également les cellules mélanotropes de l'hypophyse ou les cellules entérochromaffines (lignée BON) qui sont très étudiées (Burgoyne et Morgan, 2003). Certaines cellules sanguines concernées par les phénomènes de sécrétion lors de réponses immunitaires sont également des modèles prisés, comme les mastocytes et les granulocytes neutrophiles ou basophiles.

Enfin, le système nerveux, tout comme le système endocrinien, utilise les mécanismes d'exocytose pour communiquer avec l'ensemble du corps. Un dérèglement de l'exocytose au sein de ce système est à l'origine de pathologies caractérisées aussi bien par des désordres psychiatriques que des dysfonctionnements physiques et moteurs. La régulation de la neurotransmission est donc particulièrement étudiée, à partir le plus souvent de neurones murins en culture primaire. Néanmoins, ces mécanismes ont aussi fait l'objet d'un large panel d'investigations à partir de cellules neuroendocrines, les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale (Tischler, 2002). Ayant une origine embryonnaire commune avec les neurones,

ces cellules permettent ainsi non seulement d'étudier la sécrétion endocrine, mais également de faire un parallèle avec la libération des neurotransmetteurs.

II. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale, un modèle de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine

A. Généralités sur les cellules neuroendocrines

1. Le système endocrinien, un réseau de production d'hormones

Le système endocrinien est l'un des systèmes de communication de l'organisme, exerçant son action de façon concomitante avec le système nerveux. Il est formé d'un ensemble dispersé de glandes, telles que l'hypophyse, la glande thyroïde et les glandes surrénales, mais également de cellules isolées comme les îlots de Langerhans pancréatiques ou les cellules entérochromaffines au sein du tube digestif. Un dérèglement du système endocrinien peut ainsi être à l'origine d'un certain nombre de pathologies, telles que le diabète, le nanisme, ou le stress chronique.

Bien qu'anatomiquement distinctes, les glandes ou cellules endocrines possèdent en commun la propriété de déverser des hormones dans les capillaires sanguins qui les irriguent en réponse à un stimulus adapté. Une fois libérés, ces messagers chimiques vont pouvoir exercer des fonctions variées, à une distance importante de l'endroit où elles ont été produites. Chez les vertébrés, il existe une grande diversité d'hormones de nature peptidiques et lipidiques. Certaines d'entre elles, telles les catécholamines ou les hormones sexuelles, possèdent des propriétés spécifiques. Dans d'autres cas, elles ont des effets plus généraux, en agissant par exemple sur le métabolisme cellulaire. Les différentes hormones peuvent agir de manière synergique et en relation les unes avec les autres, la sécrétion anormale d'une hormone pouvant en effet influencer la libération d'une autre. Ce système interconnecté est indispensable au maintien de l'homéostasie d'un organisme et à son adaptation.

2. Les cellules neuroendocrines

Le système neuroendocrine se compose d'une partie du système endocrinien qui partage de nombreuses caractéristiques cytologiques et biochimiques communes avec les neurones. Les cellules neuroendocrines forment un groupe hétérogène, qui libère des hormones et des neuropeptides dans la circulation sanguine. Il est communément admis que les cellules neuroendocrines digestives, pancréatiques et pulmonaires sont d'origine endodermiques, alors que les cellules thyroïdiennes et les cellules de la médullosurrénale dérivent de la crête neurale (Montuenga *et al.*, 2003 ; Le Douarin *et al.*, 2008).

Le réseau de cellules neuroendocrines a été décrit pour la première fois au 19^{ème} siècle, dans le revêtement épithélial de l'estomac et de l'intestin (R. Heidenhain, 1870). Par la suite, la

mise en évidence de ces cellules dans de nombreux organes comme la thyroïde, le thymus ou encore l'appareil respiratoire a conduit à la description d'un « système diffus ». En effet, les cellules neuroendocrines sont localisées de manière ubiquitaire dans l'organisme adulte et la majeure partie est dispersée à l'intérieur d'un organe ou tissu, par exemple les cellules associées à la thyroïde ou au tube digestif. Ces cellules ont toutefois en commun la présence de marqueurs neuroendocrines, tels que la synaptophysine, les chromogranines, l'énolase spécifique des neurones, et des marqueurs membranaires comme NCAM (*neural cell adhesion molecule*) (Montuenga *et al.*, 2003). Par ailleurs, certains de ces marqueurs sont utilisés pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines.

Bien que d'origines diverses et dispersées dans tout l'organisme, l'ensemble des cellules neuroendocrines partagent une fonction commune : le stockage et la sécrétion des hormones et neuropeptides *via* un processus d'exocytose régulée par le calcium, en réponse à un stimulus externe. Dans les glandes neuroendocrines telles que l'hypophyse ou la médullosurrénale, le signal déclencheur est un stimulus provenant d'une terminaison synaptique, puisqu'elles sont sous le contrôle du système nerveux. La sécrétion régulée permet au système neuroendocrine de contrôler de nombreuses fonctions physiologiques en libérant dans la circulation sanguine des médiateurs qui vont agir spécifiquement sur des organes cibles.

B. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale

1. Organisation générale de la glande surrénale

Chez les mammifères, les glandes surrénales constituent une paire de glandes endocrines non symétriques, l'une triangulaire et l'autre plus aplatie et allongée. Elles sont situées, comme leur nom l'indique, juste au-dessus de chaque rein. Elles sont responsables de la libération d'un grand nombre d'hormones stéroïdes et de catécholamines.

La glande surrénale est subdivisée en une partie corticale en périphérie (corticosurrénale) et une partie médullaire au centre (médullosurrénale) (**figure 34**). Ces deux tissus glandulaires sont distincts d'un point de vue embryologique, histologique et physiologique. La corticosurrénale et la médullosurrénale ont ainsi des origines différentes, la première provenant du mésoderme alors que la deuxième dérive de l'ectoderme, plus précisément de cellules de la crête neurale (Díaz-Flores *et al.*, 2008). La corticosurrénale se compose de trois couches concentriques ayant chacune une structure histologique et des propriétés sécrétoires propres : de la périphérie vers le centre, la zone glomérulée assure la production de minéralocorticoïdes, la zone fasciculée synthétise les glucocorticoïdes et la zone réticulée sécrète les androgènes. La médullosurrénale, en revanche, est composée essentiellement de cellules chromaffines regroupées en amas autour de capillaires. Ces cellules assurent la sécrétion dans la circulation sanguine de catécholamines (adrénaline et noradrénaline), mais également de protéines de la famille des chromogranines,

ainsi que de nombreux peptides et d'autres hormones telles que la somatostatine (Aunis et Langley, 1999 ; de Diego *et al.*, 2008).

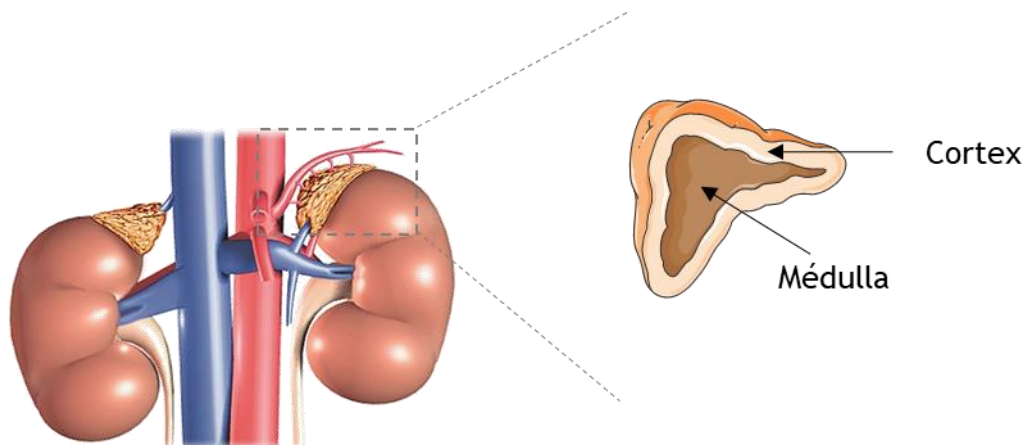


Figure 34 : Les glandes surrénales

Les glandes surrénales sont situées au-dessus de chaque rein. Elles sont composées du cortex à la périphérie (corticosurrénale) et de la médulla au centre (médullosurrénale).

2. Les modèles utilisés en culture cellulaire : avantages et inconvénients

Mes travaux de thèse concernant l'étude de l'exocytose ont été réalisés sur des cultures primaires de cellules chromaffines issues de la médullosurrénale de bœuf ou de souris, ainsi que sur des cellules de la lignée PC12. Ces différents modèles cellulaires ont permis de nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires de l'exocytose régulée (Neher, 2018). Leurs avantages et inconvénients permettant des approches complémentaires dans l'étude de la sécrétion neuroendocrine (Bader *et al.*, 2002).

a. Cellules chromaffines en culture primaire

Lorsqu'elles sont mises en culture, les cellules chromaffines fraîchement isolées adhèrent rapidement au support et prennent une forme sphérique. La morphologie adoptée par la suite dépend avant tout de la nature du milieu dans lequel les cellules sont incubées, et peut changer progressivement sur la durée de la culture. Dans certaines conditions comme un traitement au NGF (*nerve growth factor*), les cellules chromaffines vont émettre des prolongements neuritiques, qui peuvent mesurer plus de 40 μm de long et se ramifier (Bader *et al.*, 1981). Au bout de 10 jours de culture, on observe que 15% des cellules expriment des neurites alors que le reste conserve une forme ronde ou aplatie. Dans certains cas, la formation de synapses cholinergiques a pu être observée. Dans nos conditions de culture, les cellules restent sphériques et conservent leur phénotype endocrinien, se caractérisant par la formation de granules de sécrétion (Trifaró et Lee, 1980 ; Grant *et al.*, 1988).

La cellule chromaffine est un modèle de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine pour plusieurs raisons. Les cellules chromaffines sont bien caractérisées au niveau protéomique et leur contenu protéique présente de nombreuses similitudes avec les neurones du fait de leur origine commune (Rettig et Neher, 2002). De plus, leurs caractéristiques morphologiques en font un excellent modèle, permettant par exemple une analyse directe des variations de la surface de la membrane plasmique par capacitance, ainsi que des observations en microscopie TIRF. Du fait de leur taille importante et de la libération de catécholamines, les cellules chromaffines permettent également l'utilisation de techniques électrophysiologiques sur cellule unique telles que l'ampérométrie à fibre de carbone. Cette technique permet d'enregistrer les événements d'exocytose d'une cellule isolée. La quantité de catécholamines libérées par un seul granule est mesurée *via* l'oxydation de ces molécules au contact d'une fibre de carbone placée directement au contact de la membrane cellulaire et maintenue à un potentiel imposé de +650 mV (Bader *et al.*, 2002 ; Evanko, 2005). L'ampérométrie présente également l'intérêt de pouvoir étudier différents paramètres des événements individuels de sécrétion, dont la cinétique de la fusion vésiculaire.

Au laboratoire, nous réalisons des cultures primaires de cellules chromaffines de souris génétiquement modifiées, ainsi que de cellules chromaffines bovines (CCB) à partir de glandes surrénales que nous récupérons dans un abattoir. L'utilisation des CCB présente plusieurs avantages techniques non négligeables par rapport aux modèles murins. Tout d'abord, ces cellules sont aisément dissociables de la partie corticosurrénalienne et il est possible d'en recueillir un nombre considérable. En moyenne, 15 à 20 millions de cellules sont ainsi obtenues à partir d'une seule glande surrénale bovine. Ce rendement élevé permet des expériences de biochimie nécessitant une grande quantité de cellules, ainsi que des études immunocytologiques et des observations sur cellules vivantes. Il est beaucoup plus laborieux d'obtenir ce genre de données à partir de médullosurrénales de souris, qui présentent un rendement de culture jusqu'à 100 fois inférieur. Un autre avantage des CCB est leur taille relativement importante (15 à 20 μm), qui facilite les études nécessitant la manipulation de cellule unique comme la microinjection ou l'ampérométrie. Enfin, les CCB sont remplies de granules de sécrétion (30 000 en moyenne) de grande taille également (de 150 à 300 nm de diamètre), facilement observables au microscope confocal, mais aussi au microscope électronique à transmission du fait de leur forte densité aux électrons. Ces différentes propriétés ont fait des CCB un modèle de grand intérêt et largement utilisé pour l'étude de la sécrétion régulée.

Cependant, la culture primaire comporte aussi des inconvénients : les cultures peuvent présenter une variabilité d'une fois sur l'autre, et surtout les cellules sont difficilement transfectables (Bader *et al.*, 2002). Le taux de transfection des CCB par électroporation n'excède pas 30% dans des conditions optimales, ce qui est suffisant dans la plupart des cas pour des études immunocytologiques, mais rarement pour des études biochimiques. Les cellules de souris, quant à elles, sont restées complètement hermétiques aux différentes méthodes de transfection utilisées

dans l'équipe. C'est l'une des raisons pour laquelle nous travaillons aussi en parallèle sur la lignée de cellules PC12, qui présente l'avantage d'être plus facilement transfectable.

b. Lignée cellulaire PC12

La lignée de cellules PC12 est issue d'un phéochromocytome de rat (Greene et Tischler, 1976). L'utilisation de cette lignée est beaucoup plus aisée que la culture primaire de cellules chromaffines et le taux de transfection des cellules PC12 par lipofection peut atteindre jusqu'à 80%. Comme pour toute lignée cellulaire, il faut cependant rester vigilant à un changement de phénotype qui se produirait après un certain nombre de passages des cellules, et qui peut se manifester par des variations dans les taux de sécrétion ou une modification de l'adhérence des cellules au support. Les cellules PC12 peuvent aussi adopter un phénotype neuronal en réponse à un traitement au NGF et ont été ainsi largement utilisées comme modèle de différenciation neuronale (Tao-Cheng *et al.*, 1995).

Un grand nombre d'études portant sur l'exocytose des cellules neuroendocrines a également été effectué sur ce modèle. En effet, ces cellules possèdent une machinerie d'exocytose apparemment très comparable à celle présente dans les cellules chromaffines de souris et de bœuf. Quelques différences ont toutefois été notées en termes de contenu protéique, probablement dues au phénotype tumoral des cellules ou simplement à une spécificité de l'espèce considérée. Les cellules PC12 possèdent des granules de sécrétion à l'instar des CCB, mais en plus faible quantité (100 fois moins) et d'un diamètre moyen deux fois moins important (50 à 150 nm). L'exocytose des granules de sécrétion dans les cellules PC12 est étroitement régulée par le calcium et se produit en réponse à un sécrétagogue (Bader *et al.*, 2002). D'autre part, les travaux de l'équipe ont déjà permis de visualiser la synthèse de PA au niveau des sites d'exocytose dans ce modèle cellulaire tout comme dans les cellules chromaffines bovines (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Les PC12 représentent donc une bonne alternative aux cellules chromaffines en culture primaire pour étudier la dynamique du PA dans les cellules neurosécrétrices.

III. Mécanismes moléculaires de la sécrétion et implication des lipides

Revue ci-après :

Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion.

Tanguy E., Carmon O., Wang Q., Jeandel L., Chasserot-Golaz S., Montero-Hadjadje M., and Vitale N. *Journal of Neurochemistry*. 2016 Jun; 137(6):904-12

IV. Implication de la PLD dans la sécrétion neuroendocrine

Revue ci-après :

Role of Phospholipase D-Derived Phosphatidic Acid in Regulated Exocytosis and Neurological Disease.

Tanguy E., Wang Q., and Vitale N.

Handbook of Experimental Pharmacology. 2018 Dec [Epub ahead of print]

REVIEW

Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion

Emeline Tanguy,^{*,1} Ophélie Carmon,^{†,1} Qili Wang,^{*} Lydie Jeandel,[†] Sylvette Chasserot-Golaz,^{*} Maité Montero-Hadjadje[†] and Nicolas Vitale^{*}

^{*}Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[†]INSERM U982, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Université de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

Abstract

The regulated secretory pathway begins with the formation of secretory granules by budding from the Golgi apparatus and ends by their fusion with the plasma membrane leading to the release of their content into the extracellular space, generally following a rise in cytosolic calcium. Generation of these membrane-bound transport carriers can be classified into three steps: (i) cargo sorting that segregates the cargo from resident proteins of the Golgi apparatus, (ii) membrane budding that encloses the cargo and depends on the creation of appropriate membrane curvature, and (iii) membrane fission events allowing the nascent carrier to separate from the donor membrane.

These secretory vesicles then mature as they are actively transported along microtubules toward the cortical actin network at the cell periphery. The final stage known as regulated exocytosis involves the docking and the priming of the mature granules, necessary for merging of vesicular and plasma membranes, and the subsequent partial or total release of the secretory vesicle content. Here, we review the latest evidence detailing the functional roles played by lipids during secretory granule biogenesis, recruitment, and exocytosis steps.

Keywords: exocytosis, lipid, membrane, microdomain, secretion, secretory granule budding.

J. Neurochem. (2016) 10.1111/jnc.13577

[This article is part of a mini review series on Chromaffin cells \(ISCCB Meeting, 2015\).](#)

The secretory pathway is an essential cellular activity that requires synthesis, modification, sorting, and release of secretory proteins/molecules outside cells, as well as transport of cell surface components. These proteins are first created on endoplasmic reticulum (ER)-bound ribosomes and translocated into the ER lumen, where they are folded, assembled, and N-glycosylated (Braakman and Bulleid 2011). Cargo proteins (either membrane associated or soluble) are conveyed from the ER exit sites to the entry side of the Golgi apparatus and then successively pass through the different Golgi stacks, where the proteins undergo maturation and processing (Wilson *et al.* 2011). At the trans-Golgi network (TGN), proteins are sorted into specific vesicular carriers for transport and distribution to their ultimate destinations, including the endolysosomal system and the plasma membrane, by the constitutive or regulated exocytosis pathway (Gerdes 2008). On one side, all cell types recycle membranes, proteins, and extracellular matrix components through constitutive secretory vesicles that are transported directly to the cell surface where they

Received December 24, 2015; revised manuscript received January 20, 2016; accepted February 3, 2016.

Address correspondence and reprint requests to Nicolas Vitale, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France. E-mail: vitalen@unistra.fr
Maité Montero-Hadjadje, INSERM U982, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France. E-mail: maite.montero@univ-rouen.fr

¹These authors contributed equally to this work.

Abbreviations used: AA, arachidonic acid; AP, adaptor protein; AQP, aquaporin; BAR, Bin/amphiphysin/Rvs; CAPS, calcium-activator protein for secretion; CERT, ceramide transport protein; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmic reticulum; ISG, immature secretory granules; LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lyso-phosphatidylcholine; MSG, mature secretory granules; PA, phosphatidic acid; PE, phosphatidylethanolamine; PI(3)P, phosphatidylinositol-3-phosphate; PI(3,5)P₂, phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate; PI(4)P, phosphatidylinositol 4-phosphate; PI(4,5)P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKD, protein kinase D; PLD, phospholipase D; PS, phosphatidylserine; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; TGN, trans-Golgi network; VAMP, vesicle-associated membrane protein; V-ATPase, vacuolar H-ATPase.

fuse with the plasma membrane in the absence of any kind of stimuli. On the other side, the regulated pathway is a trademark of specialized secretory cells, such as neurons, endocrine, and exocrine cells, and requires the accumulation of the secretory material into dedicated organelles, the secretory granules (Vázquez-Martínez *et al.* 2012). The latter are transported through the cytoplasm toward the cell periphery, where they are exocytosed after stimulation of the cell (Burgess and Kelly 1987).

In addition to the function of important protein players in the journey of a secretory granules, lipids also contribute to key steps. Cell membranes are indeed composed of a broad spectrum of lipids with specific properties that can directly influence membrane topology, dynamics, and tasks. In addition, the lipid composition and transbilayer arrangement vary strikingly between organelles and there is compelling evidence that the collective properties of bulk lipids profoundly define organelle identity and function (Holthuis and Menon 2014). Of particular interest are changes in the physical properties of the membrane that are directly under the control of lipids, and mark the transition from early to late organelles in the secretory pathway. These include bilayer thickness, lipid packing density, and surface charge. Here, we highlight the latest evidence supporting the notion that in addition to the collective action of bulk lipids, specific minor lipids directly control directionality and functionality of the secretory pathway.

Lipids and biogenesis of secretory granules

Lipids involved in formation of budding sites at the TGN membrane

The biogenesis of secretory granules destined for the regulated secretory pathway begins like other transport vesicles by active budding at the TGN membrane. This process needs several concomitant events: the sorting of cargo and membrane components, the membrane curvature, and the recruitment of cytosolic proteins. A role for lipids in the formation of post-Golgi carriers has long been proposed, including their interactions with enzymes and other membrane-associated proteins. The development of cellular lipidomic approaches (especially mass spectrometry) has revealed (i) that the Golgi membrane of the mammalian cell contains the same lipids as those found in the plasma membrane, but in different proportions and (ii) that the two leaflets of the Golgi membrane bilayers display specific lipid compositions, sphingolipids being enriched in the luminal leaflet, whereas phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine are concentrated in the cytosolic leaflet (van Meer and de Kroon 2011). Beside these lipids, the recruitment of enzymes at the cytosolic face of the TGN membrane contributes to its remodeling through the generation of lipid metabolites, such as diacylglycerol (DAG), phosphatidic acid (PA), and phos-

phoinositides (Ha *et al.* 2012). These lipids play a central role in the formation of secretory granules. For instance, the accumulation of PA in the TGN membrane is a key factor for the budding of secretory granules (Siddhanta and Shields 1998). At low pH and high calcium concentrations, PA adopts a conical shape that favors changes in membrane topology (Kooijman *et al.* 2003). DAG also exhibits a conical shape and its accumulation in the TGN membrane has been found to facilitate membrane curvature leading to the budding of secretory granules (Asp *et al.* 2009).

The Golgi membrane also exhibits a dynamic lipid asymmetry, with the ability of cholesterol, DAG, and other glycerophospholipids to translocate spontaneously or in P4-ATPase-stimulated manner (Tang *et al.* 1996). Flippases generally maintain lipid asymmetry, but their lipid transfer activity between the two leaflets can also potentially lead to membrane curvatures that drive the budding of post-Golgi vesicles (Leventis and Grinstein 2010).

Cells are able to maintain differences in lipid composition between their organelles despite the lateral diffusion of lipids in cellular membranes. The physical differences between glycerolipids and sphingolipids make them segregate in the presence of cholesterol (Marsh 2009). In the Golgi membrane, for example, domains with different lipid compositions are targeted with unique transmembrane proteins into separate secretory vesicles. This segregation of lipids and proteins forms the sorting mechanism which cells use to maintain the specific composition of their membranes (van Meer *et al.* 2008). Originally, lipid self-organization was considered to be the major driving force behind lateral membrane organization. The formation of such functional lipid micro- or nano-domains in the bilayer remains difficult to visualize because of the lack of effective lipid probes to study molecule dynamics in living cells. Although this self-organization plays an essential role, it is plausible that membrane proteins influence lipid organization, and conversely that protein function and clustering are under the control of lipids. Notwithstanding the so-called 'lipid rafts' in Golgi membrane have been predicted to regulate the function and clustering of proteins involved in the budding of secretory granules (Surma *et al.* 2012).

Lipids involved in protein recruitment at the budding sites

The enrichment of secretory granule membrane in sphingolipids and cholesterol suggests their participation in the formation of functional microdomains involved in the budding of these organelles from the Golgi membrane (Wang and Silvius 2000). Lipid microdomains are implicated in the sorting of proteins destined for the regulated secretory pathway (Tooze *et al.* 2001), as they possess the ability to attract peripheral proteins such as carboxypeptidase E (Dhanvantari and Loh 2000), prohormone convertase PC2 (Blázquez *et al.* 2000), and secretogranin III (Hosaka *et al.*

2004). These proteins act as chaperones by tethering soluble or aggregated proteins to the secretory granule membrane (Dikeakos and Reudelhuber 2007). In secretory cells, lipid microdomains also attract aquaporins (AQP), which are transmembrane proteins that remove water, thereby allowing the condensation of aggregated granule proteins in the TGN (Arnaoutova *et al.* 2008). In the low pH and high calcium conditions found in the Golgi compartment, members of a family of soluble proteins called chromogranins induce aggregation of proteins destined to the regulated secretory pathway (Montero-Hadjadje *et al.* 2008). TGN acidification is achieved by proton pumps of the vacuolar H-ATPase (V-ATPase) family (Schapiro and Grinstein 2000). Interestingly, Li *et al.* (2014) have demonstrated that the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂) is a significant regulator of V-ATPase assembly and activity. Furthermore, phosphoinositides on the cytosolic surface recruit organelle-specific effector proteins of vesicle trafficking and signal transduction (Di Paolo and De Camilli 2006). For example, the serine/threonine protein kinase D (PKD) is recruited by binding to DAG and the GTPase ARF1, and this promotes the production of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) by activating the lipid kinase PI(4)-kinase III β . At the TGN, PI(4)P can recruit lipid transfer proteins, such as oxysterol-binding protein 1 and ceramide transport protein that control sphingolipid and sterol levels, respectively. Ceramide transport protein-mediated transport of ceramide to the TGN has been proposed to increase the local production of DAG, which is converted into PA and lysophosphatidic acid; all these lipids being necessary for fission of secretory vesicles. PKD also regulates the recruitment of Arfaptin-1 (a Bin/amphiphysin/Rvs domain protein) to PI(4)P at the TGN membrane (Cruz-Garcia *et al.* 2013). In this study, Arfaptin-1 also appears important for the sorting of chromogranin A, a member of the chromogranin family, to the regulated secretory pathway in human BON carcinoid tumor cells. These results suggest that DAG-dependent PKD recruitment is crucial for the biogenesis of secretory granules. Indeed, PKD-mediated Arfaptin-1 phosphorylation is necessary to ensure the fission of secretory granules at the TGN of pancreatic β cells (Gehart *et al.* 2012). Such a role is compatible with previous reports showing that other cellular components, such as chromogranin-induced prohormone aggregates are important for driving TGN vesicle budding after their association with membrane rafts (Gondré-Lewis *et al.* 2012).

The journey of secretory granules begins

Hormone precursors, along with other proteins of the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells, are sorted and packaged into immature secretory granules that bud off from the TGN. These organelles are rapidly conveyed to the cell periphery through their interaction with microtubules via kinesin motors (Park *et al.* 2009).

The maturation process comprises an acidification-dependent processing of cargo, condensation of the secretory granule content, and removal of lipids and proteins not destined for mature secretory granules. The acidification process occurs along the regulated secretory route resulting in a decrease in pH from the TGN (6.5–6.2), to immature secretory granules (6.3–5.7), and finally to mature secretory granules (5.5–5.0). In chromaffin cells, an increase in the proton pump density and a diminution in proton permeability of the granule membrane allow a pH drop (Apps *et al.* 1989). Moreover, the selective V-ATPase inhibitor bafilomycin A1 demonstrated the role of acidification on trafficking of specific granule proteins through the regulated secretory pathway in PC12 cells (Taupenot *et al.* 2005), a process potentially under the control of phosphoinositide levels.

During maturation in endocrine and exocrine cells, granules decrease in size as their content undergoes condensation, along with the concomitant efflux of Na⁺, K⁺, Cl⁻, and water from the granules. Water removal is ensured by the lipid microdomain-associated AQP. AQP1 is found in secretory granules of pituitary and chromaffin cells, as well as in synaptic vesicles and pancreatic zymogen granules, whereas AQP5 is found in parotid gland secretory vesicles (Ishikawa *et al.* 2005; Arnaoutova *et al.* 2008). They facilitate condensation of granular content during maturation. Upon their arrival at the cell periphery, secretory granules are trapped in the dense cortical actin network. Myosin Va together with Rab3D regulate distinct steps of the granule maturation, with an essential role of myosin Va in membrane remodeling (Kögel and Gerdes 2010) and a crucial function of Rab3D in the cargo processing (Kögel *et al.* 2013). Interestingly in yeast, oxysterol-binding protein Osh4p-recruited PI(4)P and Rab proteins are in association with a myosin V type (Myo2p) in the membrane of secretory compartments and are implicated in vesicle maturation (Santiago-Tirado *et al.* 2011).

Membrane remodeling also induces a decrease of the size of secretory granules. The presence of a clathrin coat on patches of secretory granule membrane causes shrinkage of material, mediated by the clathrin adaptator protein (AP)-1 (Dittie *et al.* 1996). As a result, membrane proteins like vesicle-associated membrane protein 4 (VAMP4), furin, and mannose 6-phosphate receptors, which have a canonical AP-1-binding site in their cytosolic domain, are present in immature secretory granules, but not anymore in mature secretory granules (Klumperman *et al.* 1998; Teuchert *et al.* 1999; Hinners *et al.* 2003). AP-1 accumulates at the cytosolic face of TGN membrane likely through PI(4)P interaction (Wang *et al.* 2003). Their transport along microtubules toward the cortical actin, a step that has not been linked to lipid yet, and the concomitant granular modifications result in the maturation and storage of secretory granules, competent for exocytosis.

Lipids and exocytosis of secretory granules

And the journey of secretory granules ends

The final stage of the secretory pathway is regulated exocytosis, a well-defined multistep process triggered by an exocytotic stimulus (Pang and Südhof 2010). The molecular machinery underlying regulated exocytosis involves assembly of a tripartite soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex between plasma and granular proteins as well as accessory proteins (Jahn and Fasshauer 2012). Extensive work over the last two decades has also shed light on the importance of lipids in the exocytosis process. In the following sections, the major contributions of membrane lipids for each step of secretory granule exocytosis will be described.

Lipids involved in formation of exocytotic sites and the docking step

Mature granules, once tethered, are recruited to exocytotic sites and this represents the initial contact between secretory granules and plasma membrane. Some lipids, such as cholesterol, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), and sphingolipids are clustered in ordered microdomains in plasma membrane, also called membrane rafts. Biochemical and high-resolution imaging observations indicate that these detergent-resistant microdomains serve to concentrate and regulate SNARE proteins, arguing for the constitution of active exocytotic sites (Salaün *et al.* 2005). Spatial definition of exocytotic sites is cholesterol dependent, as depletion of cholesterol from the plasma membrane negatively affects cluster integrity and results in reduced secretory activity by neuroendocrine cells (Lang *et al.* 2001). Furthermore, we have demonstrated that PI(4,5)P₂-enriched microdomains co-localize with SNARE clusters and docked secretory granules from analysis of immunogold labeled plasma membrane sheets (Umbrecht-Jenck *et al.* 2010).

PI(4,5)P₂ plays a critical role in translocating secretory vesicles to the plasma membrane (Wen *et al.* 2011), but also binds and regulates a large subset of proteins involved in the docking step, and therefore plays an essential role in granule recruitment at exocytotic sites (recently reviewed by Martin 2015). For instance, by modulating actin polymerization, PI(4,5)P₂ controls actin-based delivery of secretory vesicles to exocytotic sites (Trifaró *et al.* 2008). Moreover, PI(4,5)P₂ clusters organized by syntaxin-1A could act as a platform for granule docking in membrane rafts (Honigsmann *et al.* 2013). Studies in chromaffin cells have demonstrated that generation of microdomains is positively regulated by recruitment of annexin A2, a calcium- and PI(4,5)P₂-binding protein present at docking sites near SNARE complexes (Chasserot-Golaz *et al.* 2005; Umbrecht-Jenck *et al.* 2010). Using 3D electron tomography, we have recently shown that annexin A2 generates lipid domains sites by connecting cortical actin and docked secretory granules to active fusion

sites (Gabel *et al.* 2015). The actin-bundling activity of annexin A2 promotes the formation of ganglioside GM1-enriched microdomains, increases the number of morphologically docked granules at the plasma membrane, and controls the number and the kinetic of individual exocytotic events.

Altogether, these findings raise the possibility that exocytotic sites are defined by specific lipids, such as cholesterol and PI(4,5)P₂, that contribute to sequestering or stabilizing components of the exocytotic machinery. There are also indications that other lipids contribute to the establishment of exocytotic sites. For instance, PS resides mostly in the cytosolic leaflet of plasma membrane in unstimulated conditions. However, during exocytosis of secretory granules in numerous secretory cell types, notably neuroendocrine cells, PS translocates to the outer leaflet (Vitale *et al.* 2001). An ultrastructural analysis has recently demonstrated that PS is externalized in the vicinity of the docking sites of secretory granules, although the functional relevance of this PS externalization for fusion is still under debate (Ory *et al.* 2013). Another lipid implicated in regulated exocytosis is PA. Silencing of the PA-producing enzyme phospholipase D1 (PLD1) and the ectopic expression of a catalytically dead PLD1 form in chromaffin cells affected the number of exocytotic events, as revealed by capacitance recordings and carbon fiber amperometry (Zeniou-Meyer *et al.* 2007). In line with these observations, PA has recently been proposed to regulate docking in sea urchin eggs (Rogasevskaia and Coorsen 2015). Finally, analysis of plasma membrane SNARE microdomains in chromaffin cells by total internal reflection fluorescent microscopy suggests that exogenous addition of the polyunsaturated fatty acid arachidonic acid (AA) enhances docking of granules (García-Martínez *et al.* 2013). Thus, investigations using novel high-resolution imaging techniques combined with acute modifications of individual lipid composition in a given membrane will probably further elucidate the contribution of lipids to the organization of the exocytotic platform.

Lipids regulating molecular mechanisms of priming steps

Priming steps depend on molecular events, essentially involving SNARE complex assembly, and are necessary to render vesicles fusion competent (Klenchin and Martin 2000). There is also growing evidence that lipids are implicated in priming, as indicated by lipid reorganization provoked by inositol kinases and lipases during this step. Phosphoinositides such as PI(4,5)P₂ seem to be key regulators of secretion, not only by regulating the docking step but also by controlling the size and refilling rate of the readily releasable pool of granules. Electrophysiological studies modulating PI(4,5)P₂ levels and using over-expressed PI(4,5)P₂ fluorescent probes revealed that a high level of PI(4,5)P₂ in chromaffin cells positively modulates secretion by increasing the size of the primed vesicle pool,

whereas the constants of the fusion rate were not affected (Milosevic *et al.* 2005). In agreement with this concept, we recently found that the HIV protein Tat sequesters plasmalemmal PI(4,5)P₂ in neuroendocrine cells and subsequently reduces the number of exocytotic events, without significantly affecting the kinetics of fusion (Tryoen-Toth *et al.* 2013). Moreover, *in vitro* experiments using liposomes have previously reported that PI(4,5)P₂ can recruit priming factors such as calcium-activator protein for secretion (CAPS), which facilitates SNARE-dependent fusion (James *et al.* 2008). However, it seems that a well-regulated balance between plasmalemmal PI(4,5)P₂ synthesis and breakdown is mandatory for exocytosis. Indeed, DAG production through hydrolysis of PI(4,5)P₂ by phospholipase C is crucial for exocytosis in mast cells (Hammond *et al.* 2006). As for PI(4,5)P₂, DAG formation is essential for priming, leading to activation of protein kinase C and Munc-13, which then modulate the function of syntaxin-1A (Sheu *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2007).

On the granule membrane, phosphoinositides have also been implicated in priming. For instance, experiments on permeabilized chromaffin cells have shown that synthesis of phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) on secretory granules positively regulates secretion. Formation of PI3P is mediated by an isoform of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), PI3K-C2 α , particularly enriched on chromaffin granule membranes, suggesting that PI3K-C2 α production of PI(3)P has a specific role in the ATP-dependent priming phase of exocytosis (Meunier *et al.* 2005). Genetic and pharmacological inhibition of PI3K-C2 α activity resulted in a complete inhibition of secretion, suggesting that PI(3)P synthesis is necessary for exocytosis to occur (Meunier *et al.* 2005). This notion has been validated by experiments showing that stimulation of exocytosis up-regulated PI(3)P levels on granules, whereas enzymatic conversion of PI3P in PI(3,5)P₂ negatively affected exocytosis (Osborne *et al.* 2008; Wen *et al.* 2008). A similar effect on insulin secretion has been reported in pancreatic β cells with impaired PI3K-C2 α activity (Dominguez *et al.* 2011). Taken together, PI(3)P production by PI3K-C2 α on chromaffin granule membrane can be proposed to act as an essential priming signal for secretory granules, although the effectors directly involved remain to be characterized. Altogether these observations suggest that phosphoinositide metabolism is finely regulated to control the number of fusion-competent granules.

Other lipids have recently emerged as additional modulators of the priming step. AA, a polyunsaturated fatty acid of the omega-6 family has been described to potentiate exocytosis from chromaffin cells (Vitale *et al.* 1994, 2010; Latham *et al.* 2007). *In vitro* assays on protein interactions have revealed that AA can directly interact with SNAREs, like syntaxin-1a or syntaxin-3, and potentiate their assembly with SNAP-25 (Darios and Davletov 2006). Interestingly, this effect of AA on SNARE complex formation *in vitro* can

be reproduced by other omega-3 and omega-6 fatty acids, suggesting that polyunsaturated lipids may physiologically regulate SNARE complex assembly by targeting syntaxin isoforms (Darios and Davletov 2006). Along this line, work with snake phospholipase acting as neurotoxin substantiates the notion that free fatty acids and lysophospholipids promote neurosecretion (Rigoni *et al.* 2005). Furthermore, production of sphingosine, *via* hydrolysis of vesicular membrane sphingolipids, also facilitated SNARE complex assembly by activating the vesicular SNARE synaptobrevin (Darios *et al.* 2009). Finally, *in vitro* fusion assays have demonstrated that PA binds syntaxin-1 and promotes SNARE complex assembly (Lam *et al.* 2008; Mima and Wickner 2009).

'Fusogenic lipids' for membrane merging and release of content

Many observations are in agreement that lipids have also a crucial role in the fusion reaction. Thus, the most widely accepted lipidic model for membrane fusion is the stalk pore model, defined by the merging of cis-contacting monolayers, leading to a negatively curved lipid structure called a stalk (Chernomordik and Kozlov 2008). During exocytosis, the outer leaflet of the granule and the inner leaflet of the plasma membrane seemingly form the stalk. As a result of differences in the geometry of lipids, lipid composition of membranes presumably influences the structure of the stalk and subsequently efficacy of exocytosis. Theoretically, cone-shaped lipids such as cholesterol, DAG, or PA, which have intrinsic negative curvatures when found in the inner (cis) leaflets of contacting bilayers could promote fusion. On the contrary, inverted cone-shaped lipids (PS, gangliosides, or lysophospholipids) are supposed to be present in the outer (trans) leaflets. This concept has been partially validated using reconstituted fusion assays and directly by adding lipids to cell cultures. These results indicate that PA, DAG, and cholesterol, may promote fusion by changing the spontaneous curvature of membranes (Ammar *et al.* 2013).

PA is present in the inner leaflet of the plasma membrane, but presumably in very small quantities in resting conditions. Based on the pivotal role of this lipid in exocytosis (Bader and Vitale 2009), the visualization of local formation of PA has been a recurring issue. Use of PA-specific probes coupled to ultrastructural analysis allowed us to visualize PA accumulation at the plasma membrane in stimulated chromaffin cells, near morphological docking sites (Zeniou-Meyer *et al.* 2007). Moreover, silencing of PLD1 has suggested that PA production is necessary to facilitate membrane fusion after early steps of exocytosis, probably by modifying membrane topology in the proximity of docking sites. In favor of this model, extracellular lyso-phosphatidylcholine (LPC) application partially rescued secretion from PLD1-depleted cells (Zeniou-Meyer *et al.* 2007). PLD1 activity at the plasma membrane, and subsequently PA

synthesis during exocytosis, is itself regulated by PI(4,5)P₂ (Du *et al.* 2003). As PA is also an essential co-factor of PI5K, which produces PI(4,5)P₂, a positive feedback loop for the synthesis of these two lipids may be activated during exocytosis (Cockcroft 2009).

In conclusion, the local accumulation of different fusogenic lipids, such as PA, PI(4,5)P₂, DAG, and cholesterol at or near granule docking sites may have a synergistic effect on membrane curvature and thereby promote fusion. However, the precise localization of these lipids during the course of the fusion pore formation, expansion, and closure remains elusive and requires significant advances in imaging techniques and lipid sensors. Finally, a novel mass spectrometry method has recently revealed that saturated free fatty acids

are actively generated in stimulated neurosecretory cells and neurons (Narayana *et al.* 2015), but at present it is not known if these fatty acids have a direct role in exocytosis or if they are degradation products of fusogenic lipids.

Ending the journey or a new beginning?

Membrane fusion during exocytosis can occur through three different modes in secretory cells, depending on the physiological demand: kiss and run, cavicapture, or full-collapse fusion. After full-collapse fusion of the granules upon stimulation, the secretory granule membrane components can be entirely recycled by a clathrin-mediated compensatory endocytotic process (Ceridono *et al.* 2011). Molecular mechanisms underlying the preservation of granule mem-

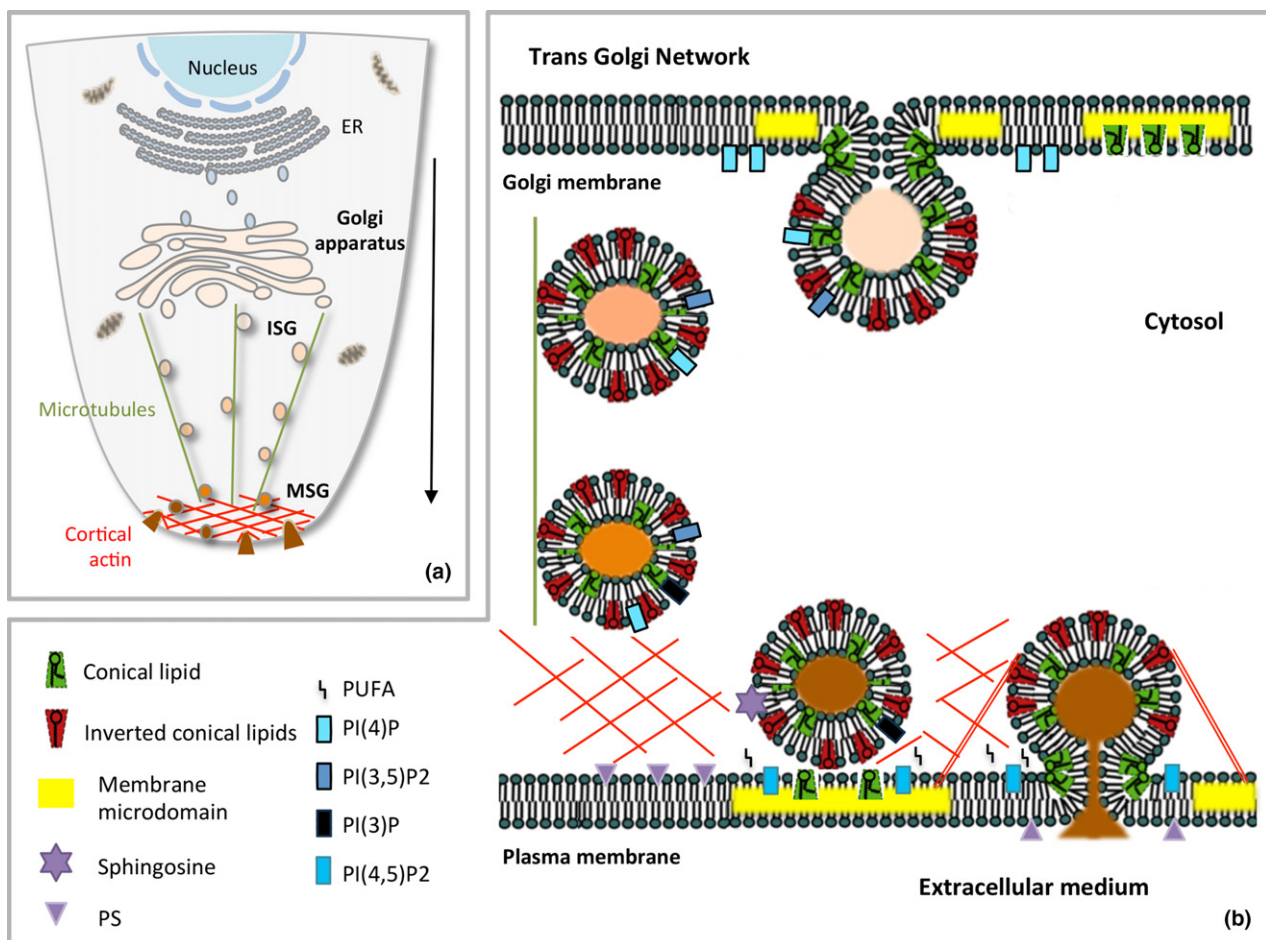


Fig. 1 Model highlighting the importance of lipids from secretory granule biogenesis to fusion. (a) The regulated secretory pathway from the Golgi apparatus to the plasma membrane. Immature secretory granules (ISG) are transported along microtubules from the trans-Golgi network (TGN) up to the cortical actin. During their active transport they are converted into mature secretory granules (MSG). (b) Lipids involved in the journey of secretory granules. Specific minor lipids directly control directionality and functionality of the regulated secretory

pathway. Conical lipids include cholesterol, diacylglycerol, phosphatidic acid, and phosphatidylethanolamine. Inverted conical lipids include lysophospholipids and PI(4,5)P₂. Omega-6 and omega-3 forms of polyunsaturated fatty acids (PUFA) are released in the cytosol by phospholipases. Membrane microdomains enriched in cholesterol, gangliosides, and sphingolipids are highlighted at the budding membrane of the TGN and at the exocytotic sites of the plasma membrane.

brane identity after fusion with plasma membrane remains unclear, but it has been proposed that specific lipid microdomains might contribute to prevent diffusion of granular components. Hence, exo-endocytosis coupling leads then to recycling of post-exocytotic internalized granule membrane back to the Golgi apparatus, starting a new life for the secretory granule (Houy *et al.* 2013). Recently lipids generated upon exocytosis have been proposed to contribute to the exo-endocytosis coupling (Yuan *et al.* 2015).

Conclusion

Lipids undoubtedly appear to contribute to almost every step along the regulated secretory pathway from the biogenesis of secretory granules to the exocytosis process (Fig. 1). However, despite the important advances in our understanding, many important answers remain far beyond our reach. The contribution of individual molecular lipid species is not known. Addressing this issue will require following the dynamics of individual lipid species at the nanometric scale, an aspect that may be achieved through the development of mass spectrometric imaging. Clearly this remains one of the most challenging issues in modern cell biology, given the large number of lipid molecules to analyze. Probing the physiological relevance of these lipids in different secretory processes is another challenging aspect for the near future. Indeed there is no doubt that an alteration of the fine cellular lipid balance, either as a consequence of an alteration of lipid metabolism or a bad diet, could contribute to dysfunction of the secretory pathway. On the other hand, determining the influence of lipid shape to membrane topology during the different steps of membrane remodeling across the secretory pathway will probably require better *in vitro* modeling of the different steps involved.

Acknowledgements and conflict of interest disclosure

We thank Dr N. Grant for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, a grant from La Ligue contre le Cancer to NV, and by a grant from the Région Haute-Normandie to MM-H. The authors declare no conflict of interest.

References

Ammar M. R., Kassas N., Chasserot-Golaz S., Bader M.-F. and Vitale N. (2013) Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front. Endocrinol.* **4**, 125.

Apps D. K., Percy J. M. and Perez-Castineira J. R. (1989) Topography of a vacuolar-type H⁺-translocating ATPase: chromaffin-granule membrane ATPase I. *Biochem. J.* **263**, 81–88.

Arnaoutova I., Cawley N. X., Patel N., Kim T., Rathod T. and Loh Y. P. (2008) Aquaporin 1 is important for maintaining secretory granule biogenesis in endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1924–1934.

Asp L., Karlberg F., Fernandez-Rodriguez J. *et al.* (2009) Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol. Biol. Cell* **20**, 780–790.

Bader M.-F. and Vitale N. (2009) Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 936–941.

Bauer C. S., Woolley R. J., Teschemacher A. G. and Seward E. P. (2007) Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-Protein-Coupled Receptors requires the priming protein Munc13-1. *J. Neurosci.* **27**, 212–219.

Blázquez M., Thiele C., Huttner W. B., Docherty K. and Shennan K. I. (2000) Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway. *Biochem. J.* **349**, 843–852.

Braakman I. and Bulleid N. J. (2011) Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 71–99.

Burgess T. L. and Kelly R. B. (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**, 243–293.

Ceridono M., Ory S., Momboisse F. *et al.* (2011) Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *Traffic* **12**, 72–88.

Chasserot-Golaz S., Vitale N., Umbrecht-Jenck E., Knight D., Gerke V. and Bader M.-F. (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1108–1119.

Chernomordik L. V. and Kozlov M. M. (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 675–683.

Cockcroft S. (2009) Phosphatidic acid regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 905–912.

Cruz-García D., Ortega-Bellido M., Scarpa M., Villeneuve J., Jovic M., Porzner M., Balla T., Seufferlein T. and Malhotra V. (2013) Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. *EMBO J.* **32**, 1717–1729.

Darios F. and Davletov B. (2006) Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* **440**, 813–817.

Darios F., Wasser C., Shakirzyanova A. *et al.* (2009) Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* **62**, 683–694.

Dhanvantari S. and Loh Y. P. (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 29887–29893.

Di Paolo G. and De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657.

Dikeakos J. D. and Reudelhuber T. L. (2007) Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J. Cell Biol.* **177**, 191–196.

Dittie A. S., Hajibagheri N. and Tooze S. A. (1996) The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J. Cell Biol.* **132**, 523–536.

Dominguez V., Raimondi C., Somanath S. *et al.* (2011) Class II Phosphoinositide 3-Kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 4216–4225.

Du G., Altschuller Y. M., Vitale N., Huang P., Chasserot-Golaz S., Morris A. J., Bader M.-F. and Frohman M. A. (2003) Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J. Cell Biol.* **162**, 305–315.

Gabel M., Delavoie F., Demais V., Royer C., Bailly Y., Vitale N., Bader M.-F. and Chasserot-Golaz S. (2015) Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J. Cell Biol.* **210**, 785–800.

- García-Martínez V., Villanueva J., Torregrosa-Hetland C. J., Bittman R., Higdon A., Darley-USmar V. M., Davletov B. and Gutiérrez L. M. (2013) Lipid metabolites enhance secretion acting on SNARE microdomains and altering the extent and kinetics of single release events in bovine adrenal chromaffin cells. *PLoS ONE* **8**, e75845.
- Gehart H., Goginashvili A., Beck R., Morvan J., Erbs E., Formentini I., De Matteis M. A., Schwab Y., Wieland F. T. and Ricci R. (2012) The BAR domain protein arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **23**, 756–768.
- Gerdes H.-H. (2008) Membrane traffic in the secretory pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2777–2780.
- Gondré-Lewis M. C., Park J. J. and Loh Y. P. (2012) Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **299**, 27–115.
- Ha K. D., Clarke B. A. and Brown W. J. (2012) Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1078–1088.
- Hammond G. R. V., Dove S. K., Nicol A., Pinxteren J. A., Zicha D. and Schiavo G. (2006) Elimination of plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is required for exocytosis from mast cells. *J. Cell Sci.* **119**, 2084–2094.
- Hinners I., Wendler F., Fei H., Thomas L., Thomas G. and Tooze S. A. (2003) AP-1 recruitment to VAMP4 is modulated by phosphorylation-dependent binding of PACS-1. *EMBO Rep.* **4**, 1182–1189.
- Holthuis J. C. M. and Menon A. K. (2014) Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **510**, 48–57.
- Honigsmann A., van den Bogaart G., Iraheta E. *et al.* (2013) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 679–686.
- Hosaka M., Suda M., Sakai Y., Izumi T., Watanabe T. and Takeuchi T. (2004) Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **279**, 3627–3634.
- Houy S., Croisé P., Gubar O., Chasserot-Golaz S., Tryoen-Tóth P., Bailly Y., Ory S., Bader M.-F. and Gasman S. (2013) Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: inseparable membranes!. *Front. Endocrinol.* **4**, 135.
- Ishikawa Y., Yuan Z., Inoue N., Skowronski M. T., Nakae Y., Shono M., Cho G., Yasui M., Agre P. and Nielsen S. (2005) Identification of AQP5 in lipid rafts and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in interlobular ducts of rat parotid gland. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, 1303–1311.
- Jahn R. and Fasshauer D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207.
- James D. J., Khodthong C., Kowalchuk J. A. and Martin T. F. J. (2008) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J. Cell Biol.* **182**, 355–366.
- Klenchin V. A. and Martin T. F. (2000) Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* **82**, 399–407.
- Klumperman J., Kuliawat R., Griffith J. M., Geuze H. J. and Arvan P. (1998) Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J. Cell Biol.* **141**, 359–371.
- Kögel T. and Gerdes H. H. (2010) Roles of myosin Va and Rab3D in membrane remodeling of immature secretory granules. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 1303–1308.
- Kögel T., Rudolf R., Hodneland E., Copier J., Regazzi R., Tooze S. A. and Gerdes H. H. (2013) Rab3D is critical for secretory granule maturation in PC12 cells. *PLoS ONE* **8**, e7321.
- Kooijman E. E., Chupin V., de Kruijff B. and Burger K. N. J. (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* **4**, 162–174.
- Lam A. D., Tryoen-Toth P., Tsai B., Vitale N. and Stuenkel E. L. (2008) SNARE-catalyzed fusion events are regulated by syntaxin1A–lipid interactions. *Mol. Biol. Cell* **19**, 485–497.
- Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C. and Jahn R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* **20**, 2202–2213.
- Latham C. F., Osborne S. L., Cryle M. J. and Meunier F. A. (2007) Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a. *J. Neurochem.* **100**, 1543–1554.
- Leventis P. A. and Grinstein S. (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 407–427.
- Li S. C., Diakov T. T., Xu T., Tarsio M., Zhu W., Couoh-Cardel S. and Weisman L. S., Kane P. M. (2014) The signaling lipid PI(3,5)P₂ stabilizes V₁-V(o) sector interactions and activates the V-ATPase. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1251–1262.
- Marsh D. (2009) Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2114–2123.
- Martin T. F. J. (2015) PI(4,5)P₂-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 785–793.
- van Meer G. and de Kroon A. I. P. M. (2011) Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8.
- van Meer G., Voelker D. and Feigenson G. (2008) Membrane lipids - where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol.* **9**, 112–124.
- Meunier F. A., Osborne S. L., Hammond G. R., Cooke F. T., Parker P. J., Domin J. and Schiavo G. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase C2α is essential for ATP-dependent priming of neurosecretory granule exocytosis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4841–4851.
- Milosevic I., Sørensen J. B., Lang T., Krauss M., Nagy G., Haucke V., Jahn R. and Neher E. (2005) Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J. Neurosci.* **25**, 2557–2565.
- Mima J. and Wickner W. (2009) Complex lipid requirements for SNARE- and SNARE chaperone-dependent membrane fusion. *J. Biol. Chem.* **284**, 27114–27122.
- Montero-Hadjadje M., Vaingankar S., Elias S., Tostivint H., Mahata S. K. and Anouar Y. (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol.* **192**, 309–324.
- Narayana V. K., Tomatis V. M., Wang T., Kvskoff D. and Meunier F. A. (2015) Profiling of free fatty acids using stable isotope tagging uncovers a role for saturated fatty acids in neuroexocytosis. *Chem. Biol.* **22**, 1552–1561.
- Ory S., Ceridono M., Mombouisse F. *et al.* (2013) Phospholipid scramblase-1-induced lipid reorganization regulates compensatory exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Neurosci.* **33**, 3545–3556.
- Osborne S. L., Wen P. J., Boucheron C., Nguyen H. N., Hayakawa M., Kaizawa H., Parker P. J., Vitale N. and Meunier F. A. (2008) PIKfyve negatively regulates exocytosis in neurosecretory cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 2804–2813.
- Pang Z. P. and Südhof T. C. (2010) Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 496–505.
- Park J. J., Koshimizu H. and Loh Y. P. (2009) Biogenesis and transport of secretory granules to release site in neuroendocrine cells. *J. Mol. Neurosci.* **37**, 151–159.
- Rigoni M., Caccin P., Gschmeissner S., Koster G., Postle A. D., Rossetto O., Schiavo G. and Montecucco C. (2005) Equivalent effects of snake PLA2 neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. *Science* **310**, 1678–1680.
- Rogasevskaia T. P. and Coorsen J. R. (2015) The role of phospholipase D in regulated exocytosis. *J. Biol. Chem.* **290**, 28683–28696.

- Salaün C., Gould G. W. and Chamberlain L. H. (2005) Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 19449–19453.
- Santiago-Tirado F. H., Legesse-Miller A., Schott D. and Bretscher A. (2011) PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev. Cell* **20**, 47–59.
- Schapiro F. B. and Grinstein S. (2000) Determinants of the pH of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 21025–21032.
- Sheu L., Pasyk E. A., Ji J., Huang X., Gao X., Varoqueaux F., Brose N. and Gaisano H. Y. (2003) Regulation of insulin exocytosis by Munc13-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 27556–27563.
- Siddhanta A. and Shields D. (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J. Biol. Chem.* **273**, 17995–17998.
- Surma M. A., Klose C. and Simons K. (2012) Lipid-dependent protein sorting at the trans Golgi network. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1059–1067.
- Tang X., Halleck M. S., Schlegel R. A. and Williamson P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**, 1495–1497.
- Taupenot L., Harper K. L. and O'Connor D. T. (2005) Role of H⁺-ATPase-mediated acidification in sorting and release of the regulated secretory protein chromogranin A: evidence for a vesiculogenic function. *J. Biol. Chem.* **280**, 3885–3897.
- Teuchert M., Schäfer W., Berghöfer S., Hoflack B., Klenk H. D. and Garten W. (1999) Sorting of furin at the trans-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 8199–8207.
- Tooze S. A., Martens G. J. M. and Huttner W. B. (2001) Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* **11**, 116–122.
- Trifaró J.-M., Gasman S. and Gutiérrez L. M. (2008) Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells: cytoskeleton and the secretory vesicle cycle. *Acta Physiol.* **192**, 165–172.
- Tryoen-Toth P., Chasserot-Golaz S., Tu A., Gherib P., Bader M.-F., Beaumelle B. and Vitale N. (2013) HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Sci.* **126**, 454–463.
- Umbrecht-Jenck E., Demais V., Calco V., Bailly Y., Bader M.-F. and Chasserot-Golaz S. (2010) S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic* **11**, 958–971.
- Vázquez-Martínez R., Díaz-Ruiz A., Almabouada F., Rabanal-Ruiz Y., Gracia-Navarro F. and Malagón M. M. (2012) Revisiting the regulated secretory pathway: from frogs to human. *Gen. Comp. Endocrinol.* **175**, 1–9.
- Vitale N., Thiersé D., Aunis D. and Bader M.-F. (1994) Exocytosis in chromaffin cells: evidence for a MgATP-independent step that requires a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein. *Biochem. J.* **300**, 217–227.
- Vitale N., Caumont A.-S., Chasserot-Golaz S., Du G., Wu S., Sciorra V. A., Morris A. J., Frohman M. A. and Bader M.-F. (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.* **20**, 2424–2434.
- Vitale N., Thiersé D. and Bader M.-F. (2010) Melittin promotes exocytosis in neuroendocrine cells through the activation of phospholipase A₂. *Regul. Pept.* **165**, 111–116.
- Wang T. and Silvius J. R. (2000) Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 1478–1489.
- Wang Y. J., Wang J., Sun H. Q., Martínez M., Sun Y. X., Macia E., Kirchhausen T., Albanesi J. P., Roth M. G. and Yin H. L. (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299–310.
- Wen P. J., Osborne S. L., Morrow I. C., Parton R. G., Domin J. and Meunier F. A. (2008) Ca²⁺-regulated pool of phosphatidylinositol-3-phosphate produced by phosphatidylinositol 3-kinase C2α on neurosecretory vesicles. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5593–5603.
- Wen P. J., Osborne S. L., Zanin M. *et al.* (2011) Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat. Commun.* **2**, 491.
- Wilson C., Venditti R., Rega L. R., Colanzi A., D'Angelo G. and De Matteis M. A. (2011) The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem. J.* **433**, 1–9.
- Yuan T., Liu L., Zhang Y. *et al.* (2015) Diacylglycerol guides the hopping of clathrin-coated pits along microtubules for exocytosis coupling. *Dev. Cell* **35**, 120–130.
- Zeniou-Meyer M., Zabari N., Ashery U. *et al.* (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* **282**, 21746–21757.



Role of Phospholipase D-Derived Phosphatidic Acid in Regulated Exocytosis and Neurological Disease

Emeline Tanguy, Qili Wang, and Nicolas Vitale

Contents

- 1 Introduction
 - 2 The Different Sources of Phosphatidic Acid
 - 3 A Fusogenic Role of PLD-Generated Phosphatidic Acid in Membrane Fusion
 - 4 A Role for PLD-Generated PA in Neurological Diseases?
 - 5 Conclusion
- References

Abstract

Lipids play a vital role in numerous cellular functions starting from a structural role as major constituents of membranes to acting as signaling intracellular or extracellular entities. Accordingly, it has been known for decades that lipids, especially those coming from diet, are important to maintain normal physiological functions and good health. On the other side, the exact molecular nature of these beneficial or deleterious lipids, as well as their precise mode of action, is only starting to be unraveled. This recent improvement in our knowledge is largely resulting from novel pharmacological, molecular, cellular, and genetic tools to study lipids *in vitro* and *in vivo*. Among these important lipids, phosphatidic acid plays a unique and central role in a great variety of cellular functions. This review will focus on the proposed functions of phosphatidic acid

E. Tanguy · Q. Wang

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 and Université de Strasbourg, Strasbourg, France

N. Vitale (✉)

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 and Université de Strasbourg, Strasbourg, France

INSERM, Paris, Cedex 13, France

e-mail: vitalen@inci-cnrs.unistra.fr

© Springer Nature Switzerland AG 2018

Handbook of Experimental Pharmacology, https://doi.org/10.1007/164_2018_180

generated by phospholipase D in the last steps of regulated exocytosis with a specific emphasis on hormonal and neurotransmitter release and its potential impact on different neurological diseases.

Keywords

Exocytosis · Lipid · Neuroendocrine · Neuron · Phosphatidic acid · Phospholipase D

1 Introduction

Complex organisms have evolved through their capacity to maintain global homeostasis. This is usually achieved by numerous cellular processes, of which some require cells to get information from distant cells/organs. Hence, a specific mechanism called regulated exocytosis allows cells to tightly control the release of informative molecules in the extracellular space before they are transported to the target cells/organs. Over the last three decades, considerable insight in this process has been gained through the study of neurotransmitter and hormonal release from neurons and neuroendocrine cells, respectively. As such, the chromaffin cell model, largely described in this review, has been very valuable to delineate the different steps of exocytosis (Bader et al. 2002). The regulated secretory pathway begins in the Golgi apparatus with the formation of specific vesicular structures called synaptic vesicles or dense-core secretory granules that are progressively filled with neurotransmitters, hormones, or neuropeptides to be secreted. After their biogenesis, these secretory vesicles are matured during their transport toward specific regions at the cell periphery, where their journey ends by the fusion with the plasma membrane and vesicular content release into the extracellular space, generally following a rise in cytosolic calcium (Burgess and Kelly 1987). This final stage of the secretory process, known as regulated exocytosis, implies successive docking and the priming of mature granules before merging of vesicular and plasma membranes to enable partial or total release of the secretory vesicle content.

It has been proposed that depending on physiological demand, at least three distinct modes of release co-exist: (1) the so-called “kiss-and-run” mode, when small molecules such as hormones and neurotransmitters are released through a narrow fusion pore, while larger molecules such as neuropeptides are retained in the vesicle; (2) vesicle cavity capture (cavicapture), in which dilation of the fusion pore permits partial release of large molecules but the omega shape of the fusing granule is maintained before closure; and (3) full collapse, wherein the vesicles flatten out in the plane of the plasma membrane, losing their round shape and completely emptying their contents (Taraska et al. 2003; Fulop and Smith 2006; van Kempen et al. 2011). It must be noted that the physiological importance of these different modes of secretion remains to be established and the molecular mechanisms that control the transition between these different modes identified.

Most studies on calcium-regulated exocytosis have focused on the minimal molecular machinery, which involves the formation of a tripartite soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex between vesicular and plasma membrane proteins (Jahn and Fasshauer 2012). However, since exocytosis ends by the fusion of two membrane compartments, it is likely that lipids also play a leading role (Tanguy et al. 2016). In the following sections, we review observations detailing the functional roles performed during exocytosis by the simplest glycerophospholipid naturally existing in all-living organisms, phosphatidic acid (PA), and consequently its potential implication in neurological disease. Indeed, although it constitutes only a minor fraction of the total cell lipids, PA has attracted considerable attention for being both a lipid second messenger and a modulator of membrane shape.

2 The Different Sources of Phosphatidic Acid

The pleiotropic functions of PA are the direct consequence of its very simple chemical structure, consisting of two acyl chains linked by ester bonds to glycerol, whose remaining hydroxyl group is esterified with a phosphomonoester group. Hence, the small phosphate headgroup of PA provides a cone-shaped structure generating flexibility and negative curvatures in the context of a lipid bilayer. In addition, the negatively charged phosphomonoester headgroup of PA can carry one or two negative charges, depending on pH and surrounding lipids, and thus can assist in the recruitment of positively charged molecules to membrane surfaces.

There are four major routes of cellular PA production in mammals. Structural PA is synthesized through two acylation reactions: the glycerol 3-phosphate (G-3-P) pathway and the dihydroxyacetone phosphate (DHAP) pathway leading to lysoPA (LPA), a mono-acylated form of PA (Fig. 1a). LPA is subsequently transformed in a second acylation step into PA (Vance and Vance 2004) (Fig. 1a). PA generated from these *de novo* pathways is a key intermediate in the synthesis of all triacylglycerols and glycerophospholipids, as it is rapidly converted by phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP) to diacylglycerol (DAG), which represents a major source for the biosynthesis of these lipids (Vance and Goldfine 2002) (Fig. 1a). Furthermore, PA can be degraded by CDP-DAG synthetase into CDP-diacylglycerol, which is directly used as substrate for the synthesis of phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycerol (PG), and cardiolipin (CL) (Fig. 1a). Finally, the many isoforms of phospholipase A (PLA) can deacylate PA into LPA (Fig. 1a). Three alternative biosynthetic pathways use distinct lipid precursors to produce what is called “signaling” PA. The first pathway involves the phosphorylation of DAG using ATP as a phosphate source by DAG kinase (DGK) to produce PA (Fig. 1a). Ten isoforms of mammalian DGK (α , β , γ , δ , η , k , ϵ , ζ , i , and θ) have been cloned, characterized, and classified in five subtypes sharing a conserved catalytic domain and at least two cysteine-rich domains (Topham 2006). The second pathway involves acylation of LPA by specific lysoPA acyltransferases (LPAAT) to generate PA (Jenkins and Frohman 2005) (Fig. 1a). Six human LPAAT isoforms have been cloned and

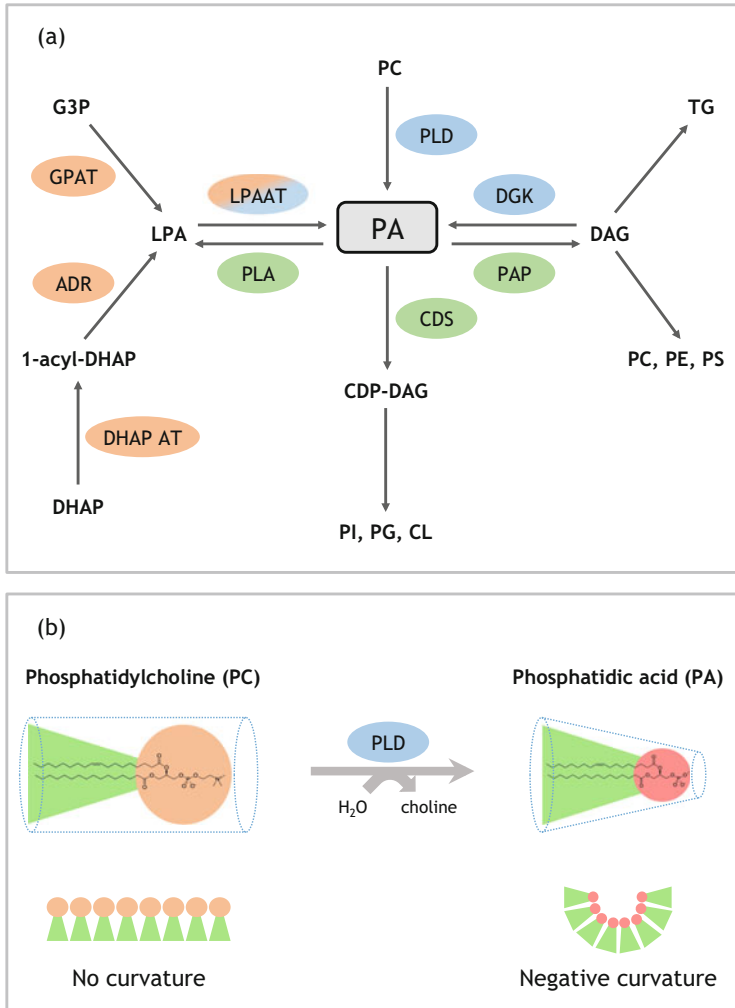


Fig. 1 PA synthesis modifies membrane topology. **(a)** Biosynthetic pathways of structural and signaling PA. PA is a central phospholipid for biosynthetic and signaling reactions. Enzymes in orange denote biosynthetic reactions that lead to structural PA synthesis, whereas enzymes involved in formation of signaling pools of PA are shown in blue. Enzymes involved in PA catabolism are shown in green. **(b)** Phosphatidylcholine hydrolysis by PLD and modification in lipid geometry. The cylindrical PC is transformed into conical PA by enzymatic PLD activity. The accumulation of cone-shaped PA creates regions of negative membrane curvature. Of note, PA exists in a single or a double negative charge mode depending on the local pH environment

characterized (Leung 2001), but more proteins displaying LPAAT activities have been recently identified. For instance, the protein RIBEYE in synaptic ribbon possesses LPAAT activity, providing PA for ultra-fast synaptic release (Schwarz et al. 2011). The third pathway involves phospholipase D (PLD), which catalyzes the

hydrolysis of the distal phosphodiester bond in phosphatidylcholine (PC) to form PA and choline (Fig. 1a). Six isoforms of PLDs have been identified based on sequence homology, but PLD1 and PLD2 are the major isoforms characterized, while thus far no direct PLD activity per se has been demonstrated for PLD3-5 (Frohman 2015). The complexity and diversity of PLD, DGK, and LPAAT families suggest that they are involved in various specific cellular functions and are probably not redundant. In general, signaling PA generated from these enzymes is implicated in multiple cell functions such as cytoskeleton organization, cell survival and proliferation, and membrane and vesicle trafficking (Nelson and Frohman 2015). Intriguingly PC to PA conversion by PLD transforms a cylindrical phospholipid into a conical one (Fig. 1b). Furthermore PA has been shown to produce negative membrane curvature through X-ray diffraction studies (Kooijman et al. 2005). Since biophysical models have proposed that intermediates of the membrane fusion reaction require such cone- or inverted cone-shaped lipid, a direct role of PA as a fusogenic lipid has been proposed (Vitale 2010).

3 A Fusogenic Role of PLD-Generated Phosphatidic Acid in Membrane Fusion

The first elements in favor of a role for PA in regulated exocytosis came from experiments showing a correlation between PLD activation and secretory activity in HL60 cells (Xie et al. 1991; Stutchfield and Cockcroft 1993). Furthermore 1-Butanol, an inhibitor of PA accumulation through the PLD pathway, also strongly affects exocytosis in a number of different cell types (Xie et al. 1991; Stutchfield and Cockcroft 1993; Caumont et al. 1998; Choi et al. 2002). Later, molecular tools established that PLD1 is a key isoform responsible for PA synthesis during catecholamine and insulin secretion (Vitale et al. 2001; Hughes et al. 2004; Huang et al. 2005; Waselle et al. 2005). Accordingly, capacitance recordings from chromaffin cells injected with a dominant-negative form of PLD1 or expressing PLD1 siRNA indicated that PLD1 controls the number of fusion-competent secretory granules docked at the plasma membrane as well as the kinetics of individual fusion events (Vitale et al. 2001; Zeniou-Meyer et al. 2007). Using similar tools, PLD1-generated PA was also reported to contribute actively to the regulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells (Disse et al. 2009). Phagocytosis is another important physiological process that depends on exocytosis of intracellular vesicles. Indeed macrophages engulf and degrade pathogens after generation of extensive plasma membrane protrusions, coming in part from different intracellular membrane compartments. This highly regulated process requires PLD2 activity at the plasma membrane for PA synthesis at the phagocytotic cup, as well as PLD1 activation required for the fusion of intracellular PLD1-positive vesicles with the plasma membrane (Corrotte et al. 2006). Another documented role for PA in secretion relates to the induction of neutrophil exocytosis of azurophilic granules by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (Williams et al. 2007). In apicomplexan parasites, such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp., specialized organelles termed

micronemes release their contents including adhesins, perforins, and proteases in a PA-dependent manner, critically contributing to invasion and egress from infected cells (Bullen et al. 2016). Sperm acrosome exocytosis also appears to be regulated by PA (Lopez et al. 2012). It must be noted, however, that in the latter case, it is rather DGK-produced PA that is important than PLD-synthesized PA. Nevertheless these results strongly support the notion that PLD-generated PA plays an important role in the last stages of exocytosis but that other sources can also provide PA for efficient secretion.

Many observations support the notion that lipids, in addition to localizing essential components of the exocytotic machinery, also directly contribute to the fusion reaction. The most widely accepted model for membrane fusion involves a combination of protein and lipid elements at the fusion site. It entails the merging of cis-contacting monolayers, leading to the formation of a specific negatively curved lipid structure called the stalk (Chernomordik and Kozlov 2008). The stalk in this case results from the merging of the inner leaflet of the plasma membrane with the outer leaflet of the vesicle prior to fusion pore formation. Cone-shaped lipids, such as PA, have been proposed to facilitate fusion through their intrinsic negative curvatures when accumulated in the inner (cis) leaflets of the contacting bilayers (Fig. 1b). Indeed the property of PA to generate non-bilayer hexagonal II phase membrane domains, particularly in the presence of calcium ions, is well documented (Jouhet 2013). This is important for exocytosis where vesicles have a large positive curvature and the formation of non-bilayer phases may help to lower the energy needed for fusion (Kozlovsky et al. 2002).

In addition to changing membrane topology, PA is unique among anionic lipids because of its small and highly charged headgroup very close to the glycerol backbone. PA tends to form microdomains through intermolecular hydrogen bonding (Boggs 1987; Demel et al. 1992). A partial reduction in charge (e.g., upon divalent cation interaction) reduces electrostatic repulsion between the PA headgroups and increases attractive hydrogen-bonding interactions, possibly resulting in fluid-fluid immiscibility and the formation of PA-enriched microdomains (Garidel et al. 1997). These highly charged microdomains may induce conformational changes in associated proteins (Iversen et al. 2015) and serve as membrane insertion sites for numerous proteins important for exocytosis that tend to accumulate at regions of membrane curvature (Jung et al. 2010; Martens 2010). More directly, PA has been proposed to contribute to many biological processes through its ability to interact with the positively charged domains of numerous proteins (Jenkins and Frohman 2005). PA can also directly serve as source for other lipids, such as DAG, that play positive function in exocytosis. Finally PA stimulates PI kinase to produce PtdIns(4,5)P₂, another key lipid needed for exocytosis (Jones et al. 2000). In fact, it is likely that PA is a critical lipid in any given physiological event through a combination of these functions (Fig. 2).

The biophysical properties of PA also imply that it should rapidly disperse within planar membranes. One possible explanation for the accumulation of PA at the exocytotic site is the occurrence of a PA-binding site that prevents PA diffusion. Such binding of PA to a protein with a highly basic motif has been reported for the

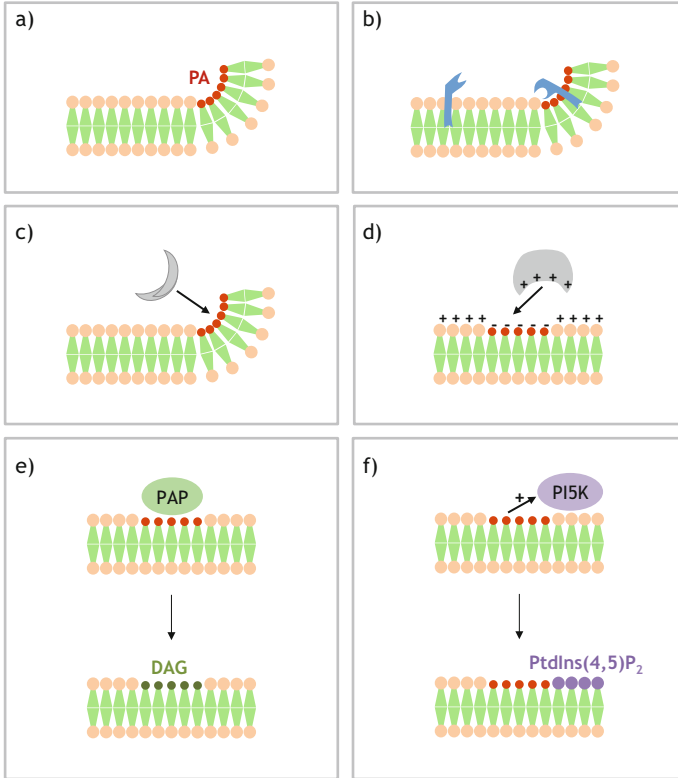


Fig. 2 Model of how PA drives signaling events. (a) Local accumulation of PA generates negative membrane curvature or (b) membrane-dependent enzymatic activity such as for interfacial activation of lipases. (c) Specific curvature-sensing proteins are recruited to PA-induced membrane curved domains. (d) Clusters of PA create local negatively charged regions that recruit PA effectors containing positively charged domains. (e) PA-phosphatases (PAP) convert PA into DAG, another signaling lipid. (f) PA potentiates the activity of PI4P5-kinase, producing PtdIns(4,5)P₂, another key signaling lipid

plasma membrane-associated SNARE protein syntaxin-1 (Lam et al. 2008) and for NSF (Jang et al. 2013). A mutation in the polybasic juxtamembrane region of syntaxin-1, which prevents binding to acidic phospholipids such as PA, strongly affects the exocytotic response of chromaffin and PC12 cells, suggesting that PA-binding may be required for the function of syntaxin-1 (Lam et al. 2008). Furthermore, the X-ray structure of this polybasic region of syntaxin-1 confirms that it is important for SNARE complex assembly and that a lipid such as PA may stabilize its orientation (Stein et al. 2009). This idea is further underscored by the observation that cone-shaped lipids that promote negative membrane curvature purify with active zone SNARE proteins (Lewis et al. 2014). Finally the strongest evidence for a direct role of PA in membrane fusion derives from in vitro reconstituted assays that revealed that PA present in a t-SNARE-containing

membrane promoted fusion with a v-SNARE-containing membrane (Vicogne et al. 2006) and studies involving a liposomal flotation assay for fusion with purified yeast vacuolar SNARE chaperones Sec17p/Sec18p and the multifunctional HOPS complex with the Sec1-Munc18 family. In the latter assay, PA was one of the lipids shown to be critical for SNARE complex assembly and fusion (Mima and Wickner 2009).

Intracellular PA levels are tightly controlled, i.e., PA is maintained at very low levels under resting conditions. Visualization of the local formation of PA has necessitated the design of a novel PA-specific sensor derived from the yeast homologue of SNAP25. Ultrastructural analysis revealed PA accumulation near docking sites at the plasma membrane during exocytosis in chromaffin cells (Zeniou-Meyer et al. 2007). Supporting the notion that the intrinsic curvature of PA in the inner leaflet of the plasma membrane contributes to the regulation of fusion pore formation and/or expansion, extracellular application of the inverted cone-shaped lipid lysophosphatidylcholine (LPC) partially rescued secretion from PLD1-depleted cells (Zeniou-Meyer et al. 2007). Interestingly, low levels of PA before exocytosis are probably maintained, since the major source of PA during exocytosis is low-level basal activity PLD1 (Vitale et al. 2001; Hughes et al. 2004). In fact, a complex node of GTPases including Arf6 (Vitale et al. 2002; Béglié et al. 2009), Ral A (Vitale et al. 2005), and Rac1 (Momboisse et al. 2009) and their own regulators (Audebert et al. 2004; Meyer et al. 2006), but also the kinase RSK2, involved in X-linked mental retardation (Zeniou-Meyer et al. 2008), and PtdIns(4,5)P₂ itself (Du et al. 2003), appear altogether to control PLD1 activation for efficient exocytosis in chromaffin cells. Similarly regulators such as Arf6, RalA, and PtdIns(4,5)P₂ have also been identified in the activation of PLD as required for insulin secretion (Grodniczky et al. 2007; Ljubicic et al. 2009; Waselle et al. 2005).

In conclusion the local buildup of fusogenic lipids such as PA together with other key lipids such as PtdIns(4,5)P₂, DAG, and cholesterol presumably at the neck or near the fusion pore may synergize by changing membrane curvature, together with SNARE-mediated membrane apposition and destabilization, to promote fusion pore formation and/or regulate its stability. The recent development of isoform-specific inhibitors will most likely prove to be useful to define more precisely steps controlled by PLD-generated PA. In addition, the precise localization of these different fusogenic lipids during the short-lived fusion pore formation, expansion, and closure is still unknown and needs important improvement in high-resolution imaging techniques and lipid probes to be adequately addressed. It must be also noted that the contribution of PA in early steps of the secretory pathway have not been as well investigated (Gasman and Vitale 2017). For instance, recent findings suggest that PLD-generated PA mostly affects docking and priming in sea urchin egg fusion (Rogasevskaia and Coorsen 2015) and as well is involved in early steps of sperm acrosomal exocytosis (Lopez et al. 2012).

4 A Role for PLD-Generated PA in Neurological Diseases?

Numerous lipids have been shown to be involved in pre- and post-synaptic functions and neurological diseases (Lauwers et al. 2016). PLD1 largely localizes to neurons in the central nervous system but is also present in oligodendrocytes, while PLD2 is largely found in astrocytes (Kim et al. 2010; Rohrbough and Broadie 2005; Zhang et al. 2004). However, the expression of PLD isoforms in the brain has been relatively controversial in regard to the cell type, isoform expression, and pattern of expression throughout development (Klein 2005). In fact, only a few recent papers have reported the time course of PLD1 expression in maturing neuronal cell cultures, with optimal expression at DIV5-6, then decreasing by more than 50% (Zhu et al. 2012) or 80% (Ammar et al. 2015). It is likely that the relative uncertainty of the PLD isoform expression pattern relies from the limited quality of the anti-PLD antibodies available and from the different types of neuronal culture used in these studies. To date, the strongest evidence that PLD1 may be involved in neurotransmission comes from experiments where injection of catalytically inactive PLD1 protein into presynaptic cholinergic neurons in the buccal ganglion of *Aplysia californica* led to a fast and dose-dependent inhibition of acetylcholine release, suggesting that a rapid exchange of inactive dominant-negative PLD1 for wild-type PLD1 causes a dramatic decrease in the amount of exocytosis (Humeau et al. 2001). These results support the notion that PLD1 generates PA-rich microdomains that recruit or activate proteins required for synaptic vesicle fusion with the plasma membrane (Humeau et al. 2009). These PA-rich domains might also physically bend the membrane to promote mixing of the lipids in the plasma and vesicle membranes during fusion as described previously. Since null mutations in RSK2, a kinase that regulates PLD1 activity, are responsible for the symptoms of the Coffin Lowry Syndrome disease, it has been proposed that alteration of PLD1 activation could explain the intellectual disabilities of patients through at least partially inhibiting neurotransmitter exocytosis (Zeniou-Meyer et al. 2008, 2010). Conversely, PLD2 has been implicated in the modulation of glutamate transporter function (Mateos et al. 2012) and the internalization of mGluR (Bhattacharya et al. 2004), both of which could potentially affect synaptic activity. Alteration of the DAG-PA balance could also be responsible for some of the cellular and behavioral symptoms observed in a mouse model of fragile X disease (Tabet et al. 2016a, b).

In the presence of low amounts of ethanol, PLD produces phosphatidylethanol at the expense of PA. So although ethanol does not inhibit PLD activity per se, it has long been used as disruptor of signaling pathways that involve PLD activation (Frohman 2015). As indicated above, PA is a lipid second messenger in its own right, with several downstream targets that relate to cell proliferation. Ethanol, on the other hand, has long been known to suppress proliferation of brain cells, especially astrocytes in vitro and in vivo. Astrocytes are more sensitive than neurons to ethanol, at least concerning proliferation. Thus, the inhibition of astroglial proliferation by ethanol has been suggested to be responsible for some features of fetal alcohol syndrome. Children born from heavy-drinking pregnant women have characteristic facial features and reduced brain and body weights, with microcephaly indicating a

delay in growth and maturation of the brain (Guerri and Renau-Piqueras 1997; Guizzetti et al. 1997). As numerous studies have validated the activation of PLD in the brain by mitogenic and growth factors, it is likely that PLD1/2-generated PA plays an important role in normal brain development and that alteration of these PLD activities is responsible for some of the brain developmental pathologies.

In addition to its effect on cell proliferation, PLD is also likely to play a role in neuronal development by promoting extension of neurites. PLD activity has been implicated in neurite outgrowth in various neuronal models for over two decades, but most of the original findings relied on the use of ethanol as a non-specific inhibitor of PA synthesis, and in most cases the PLD isoform involved was not identified (Klein 2005). Using a combination of knockout mice, a gene-silencing approach, and the recently described isoform-specific PLD inhibitors, it has more recently been demonstrated that PLD1 contributes to neurite outgrowth, dendrite branching, and spine development (Ammar et al. 2013). It is also worth mentioning that the GTPase RalB promotes neuronal branching through a pathway involving PLD (Lalli and Hall 2005). Conversely, however, using different methods to modulate protein levels and neuronal type, PLD1 has been described to negatively regulate dendritic branching in hippocampal neurons (Zhu et al. 2012). Interestingly, PLD1 was recently shown to participate in the BDNF signaling pathway in cortical neurons, supporting the notion of neuronal development regulation by PLD (Ammar et al. 2015).

The data discussed above implicate the PLD pathway in brain development, but PLD-generated PA has also been shown to be involved in neurodegeneration. Indeed, increased PLD activity has been found in Alzheimer brains postmortem (Kanfer et al. 1996), and other studies have noted that β -amyloid increases PLD expression and activity (Klein 2005). Moreover, synucleins, which are present in amyloid plaques in Alzheimer's disease and in Parkinson's disease, interact with and inhibit PLD (Jenco et al. 1998; Ahn et al. 2002; Payton et al. 2004). However, mass spectrometry analysis of Huntington's disease mouse brains reveals modification of the levels of few PA species (Vodicka et al. 2015). Of note, it was recently suggested that α -synuclein may cross-bridge vesicular SNARE and acidic phospholipids such as PA to facilitate SNARE-dependent vesicle docking, suggesting a possible link between these diseases and alteration of vesicular trafficking regulated by PLD (Lou et al. 2017). Furthermore both oxidative and antioxidative compounds have been reported to modulate PLD activity in neuronal and glial cells (Oh et al. 2000; Servitja et al. 2000; Kim et al. 2004a, b). Interestingly, PLD1 appears to regulate the intracellular trafficking of presenilin 1/ γ -secretase (Liu et al. 2009), while the memory deficit in a transgenic model of Alzheimer disease was rescued when the PLD2 gene was ablated (Oliveira et al. 2010). In line with this finding, lipidomic analysis revealed that levels of several PA species were modified in this mouse model and in Alzheimer's disease brain patients (Oliveira et al. 2010). PLD activities were also investigated in acute neurodegeneration induced by brain ischemia. *In vitro*, acute hypoxia did not change PLD activity in hippocampal slices (Klein et al. 1993), but global ischemia *in vivo* diminished PLD activity in rat brain (Nishida et al. 1994). A massive increase in PLD1 expression was observed in reactive astrocytes from the hippocampus at 7 to 10 days after forebrain ischemia *in vivo* (Lee et al. 2000). Increased PLD expression

apparently accompanies astrogliosis, repair, and remodeling of tissue after ischemia, and astrogliosis during inflammation could underlie increased PLD1 expression in scrapie-infected mouse brain (Jin et al. 2005) and in sciatic neurons during experimental autoimmune neuritis (Shin et al. 2002). Prenatal stress induces brain abnormalities of the offspring, with disruption of dendritic profiles, spine distribution, and adult neurogenesis, all of which can lead to pain hypersensitivity that is dependent on PLD1 signaling (Sun et al. 2013). Finally, compression injury of rat spinal cord (Jung et al. 2010), cryoinjury in rat cortex (Kim et al. 2004a), and kainate-induced seizures in rat hippocampus (Kim et al. 2004c) lead to increased PLD activity in astrocytes. Taken together, these pioneer studies contributed to the notion that PLD expression and activity accompany normal brain development and remodeling and that alterations of PLD-generated PA levels correlate and/or are directly responsible for different human neurological diseases. It is evident that understanding the exact role of PA in these pathologies remains the next challenge.

5 Conclusion

The last two decades have seen generation of substantial evidence that PA synthesized by different enzymatic pathways contributes to normal and pathological conditions. Among these strong indications is a direct contribution of PLD-generated PA in the last steps of regulated exocytosis, a key process that allows cells to release informative molecules such as hormones, neurotransmitters, and neuropeptides. Despite our increased understanding, the exact molecular steps affected and targets of PA action are still elusive. In addition, recent lipidomic analyses have revealed that, based on their fatty acid composition, three to four dozen distinct species of PA co-exist in most cells (Andreyev et al. 2010; Kassas et al. 2017; Oliveira et al. 2010). The function of each of these PA species, however, remains completely unknown. Therefore, the development of novel tools to further decipher the role of each PA species in regulated exocytosis, neurological diseases, and many other key cellular functions is now required. This is especially important as membrane-lipid therapies are expected to become new efficient treatments for many human pathologies (Escribá 2017).

References

- Ahn BH, Rhim H, Kim SY, Sung YM, Lee MY, Choi JY, Wolozin B, Chang JS, Lee YH, Kwon TK, Chung KC, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH, Min DS (2002) alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem* 277(14):12334–12342
- Ammar MR, Humeau Y, Hanauer A, Nieswandt B, Bader MF, Vitale N (2013) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neurite outgrowth through phosphorylation of phospholipase D1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid. *J Neurosci* 33(50):19470–19479
- Ammar MR, Thahouly T, Hanauer A, Stegner D, Nieswandt B, Vitale N (2015) PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Sci Rep* 5:14778

- 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, Raetz CR, Russell DW, Subramaniam S, Dennis EA (2010) Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J Lipid Res* 51(9):2785–2797
- Audebert S, Navarro C, Nourry C, Chasserot-Golaz S, Lécine P, Bellaiche Y, Dupont JL, Premont RT, Sempéré C, Strub JM, Van Dorsselaer A, Vitale N, Borg JP (2004) Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor. *Curr Biol* 14(11):987–995
- Bader MF, Holz RW, Kumakura K, Vitale N (2002) Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann N Y Acad Sci* 971:178–183
- Béglé A, Tryoen-Tóth P, de Barry J, Bader MF, Vitale N (2009) ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 284(8):4836–4845
- Bhattacharya M, Babwah AV, Godin C, Anborgh PH, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SS (2004) Ral and phospholipase D2-dependent pathway for constitutive metabotropic glutamate receptor endocytosis. *J Neurosci* 24(40):8752–8761
- Boggs JM (1987) Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim Biophys Acta* 906(3):353–404
- Bullen HE, Jia Y, Yamaryo-Botté Y, Bisio H, Zhang O, Jemelin NK, Marq JB, Carruthers V, Botté CY, Soldati-Favre D (2016) Phosphatidic acid-mediated signaling regulates microneme secretion in toxoplasma. *Cell Host Microbe* 19(3):349–360
- Burgess TL, Kelly RB (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 3:243–293
- Caumont AS, Galas MC, Vitale N, Aunis D, Bader MF (1998) Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J Biol Chem* 273(3):1373–1379
- Chernomordik LV, Kozlov MM (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15(7):675–683
- Choi WS, Kim YM, Combs C, Frohman MA, Beaven MA (2002) Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. *J Immunol* 168(11):5682–5689
- Corrotte M, Chasserot-Golaz S, Huang P, Du G, Ktistakis NT, Frohman MA, Vitale N, Bader MF, Grant NJ (2006) Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* 7(3):365–377
- Demel RA, Yin CC, Lin BZ, Hauser H (1992) Monolayer characteristics and thermal behaviour of phosphatidic acids. *Chem Phys Lipids* 60:209–223
- Disse J, Vitale N, Bader MF, Gerke V (2009) Phospholipase D1 is specifically required for regulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood* 113:973–980
- Du G, Altshuler YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, Bader MF, Frohman MA (2003) Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* 162(2):305–315
- Escribá PV (2017) Membrane-lipid therapy: a historical perspective of membrane-targeted therapies – from lipid bilayer structure to the pathophysiological regulation of cells. *Biochim Biophys Acta* 1859(9 Pt B):1493–1506
- Frohman MA (2015) The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 36(3):137–144
- Fulop T, Smith C (2006) Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells. *Biochem J* 399(1):111–119
- Garidel P, Johann C, Blume A (1997) Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH. *Biophys J* 72(5):2196–2210
- Gasman S, Vitale N (2017) Lipid remodelling in neuroendocrine secretion. *Biol Cell* 109(11):381–390
- Grodniczky JA, Syed N, Kimber MJ, Day TA, Donaldson JG, Hsu WH (2007) Somatostatin receptors signal through EFA6A-ARF6 to activate phospholipase D in clonal beta-cells. *J Biol Chem* 282(18):13410–13418

- Guerri C, Renau-Piqueras J (1997) Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol Neurobiol* 1(1):65–81
- Guizzetti M, Catlin M, Costa LG (1997) The effects of ethanol on glial cell proliferation: relevanceto the fetal alcohol syndrome. *Front Biosci* 2:e93–e98
- Huang P, Altschuller YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA (2005) Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell* 16(6):2614–2623
- Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, Frohman MA, Biden TJ (2004) Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic p-cells. *J Biol Chem* 279:27534–27541
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B (2001) A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26):15300–15305
- Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N (2009) X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem* 109(1):1–14
- Iversen L, Mathiasen S, Larsen JB, Stamou D (2015) Membrane curvature bends the laws of physics and chemistry. *Nat Chem Biol* 11(11):822–825
- Jahn R, Fasshauer D (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490(7419):201–207
- Jang HJ, Yang YR, Kim JK, Choi JH, Seo YK, Lee YH, Lee JE, Ryu SH, Suh PG (2013) Phospholipase C- γ 1 involved in brain disorders. *Adv Biol Regul* 53(1):51–62
- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry* 37(14):4901–4909
- Jenkins GM, Frohman MA (2005) Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62(19–20):2305–2316
- Jin JK, Kim NH, Min DS, Kim JI, Choi JK, Jeong BH, Choi SI, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2005) Increased expression of phospholipase D1 in the brains of scrapie-infected mice. *J Neurochem* 92(3):452–461
- Jones DH, Morris JB, Morgan CP, Kondo H, Irvine RF, Cockcroft S (2000) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J Biol Chem* 275(18):13962–13966
- Jouhet J (2013) Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Front Plant Sci* 4:494
- Jung AG, Labarrera C, Jansen AM, Qvortrup K, Wild K, Kjaerulff O (2010) A mutational analysis of the endophilin-A N-BAR domain performed in living flies. *PLoS One* 5:e9492
- Kanfer JN, Singh IN, Pettegrew JW, McCartney DG, Sorrentino G (1996) Phospholipid metabolism in Alzheimer's disease and in a human cholinergic cell. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14(1–3):361–363
- Kassas N, Tanguy E, Thahouly T, Fouillen L, Heintz D, Chasserot-Golaz S, Bader MF, Grant NJ, Vitale N (2017) Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J Biol Chem* 292(10):4266–4279
- Kim J, Min G, Bae YS, Min DS (2004a) Phospholipase D is involved in oxidative stress-induced migration of vascular smooth muscle cells via tyrosine phosphorylation and protein kinase C. *Exp Mol Med* 36(2):103–109
- Kim SY, Ahn BH, Min KJ, Lee YH, Joe EH, Min DS (2004b) Phospholipase D isozymes mediate epigallocatechin gallate-induced cyclooxygenase-2 expression in astrocyte cells. *J Biol Chem* 279(37):38125–38133
- Kim SY, Min DS, Choi JS, Choi YS, Park HJ, Sung KW, Kim J, Lee MY (2004c) Differential expression of phospholipase D isozymes in the hippocampus following kainic acid-induced seizures. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:812–820
- Kim M, Moon C, Kim H, Shin MK, Min do S, Shin T (2010) Developmental levels of phospholipase D isozymes in the brain of developing rats. *Acta Histochem* 112(1):81–91

- Klein J (2005) Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J Neurochem* 94(6):1473–1487
- Klein J, Holler T, Cappel E, Köppen A, Löffelholz K (1993) Release of choline from rat brain under hypoxia: contribution from phospholipase A2 but not from phospholipase D. *Brain Res* 630(1–2):337–340
- Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, de Kruijff B, Burger KN, Rand PR (2005) Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44(6):2097–2102
- Kozlovsky Y, Chernomordik LV, Kozlov MM (2002) Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys J* 83(5):2634–2651
- Lalli G, Hall A (2005) Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J Cell Biol* 171(5):857–869
- Lam IP, Siu FK, Chu JY, Chow BK (2008) Multiple actions of secretin in the human body. *Int Rev Cytol* 265:159–190
- Lauwers E, Goodchild R, Verstreken P (2016) Membrane lipids in presynaptic function and disease. *Neuron* 90(1):11–25
- Lee MY, Kim SY, Min DS, Choi YS, Shin SL, Chun MH, Lee SB, Kim MS, Jo YH (2000) Upregulation of phospholipase D in astrocytes in response to transient forebrain ischemia. *Glia* 30(3):311–317
- Leung DW (2001) The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci* 6(1):D944–D953
- Lewis KT, Maddipati KR, Taatjes DJ, Jena BP (2014) Neuronal porosome lipidome. *J Cell Mol Med* 18(10):1927–1937
- Liu Y, Zhang YW, Wang X, Zhang H, You X, Liao FF, Xu H (2009) Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1. *J Biol Chem* 284(18):12145–12152
- Ljubic S, Bezzi P, Vitale N, Regazzi R (2009) The GTPase RalA regulates different steps of the secretory process in pancreatic beta-cells. *PLoS One* 4(11):e7770
- Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA (2012) Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol* 33(8):406–412
- Lou X, Kim J, Hawk BJ, Shin YK (2017) α -Synuclein may cross-bridge v-SNARE and acidic phospholipids to facilitate SNARE-dependent vesicle docking. *Biochem J* 474(12):2039–2049
- Martens S (2010) Role of C2 domain proteins during synaptic vesicle exocytosis. *Biochem Soc Trans* 38:213–216
- Mateos MV, Giusto NM, Salvador GA (2012) Distinctive roles of PLD signaling elicited by oxidative stress in synaptic endings from adult and aged rats. *Biochim Biophys Acta* 1823(12):2136–2148
- Meyer MZ, Déliot N, Chasserot-Golaz S, Premont RT, Bader MF, Vitale N (2006) Regulation of neuroendocrine exocytosis by the ARF6 GTPase-activating protein GIT1. *J Biol Chem* 281(12):7919–7926
- Mima J, Wickner W (2009) Phosphoinositides and SNARE chaperones synergistically assemble and remodel SNARE complexes for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(38):16191–16196
- Momboisse F, Lonchamp E, Calco V, Ceridono M, Vitale N, Bader MF, Gasman S (2009) betaPIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells. *J Cell Sci* 122(Pt 6):798–806
- Nelson RK, Frohman MA (2015) Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *J Lipid Res* 56(12):2229–2237
- Nishida A, Emoto K, Shimizu M, Uozumi T, Yamawaki S (1994) Brain ischemia decreases phosphatidylcholine-phospholipase D but not phosphatidylinositol-phospholipase C in rats. *Stroke* 25(6):1247–1251

- Oh SO, Hong JH, Kim YR, Yoo HS, Lee SH, Lim K, Hwang BD, Exton JH, Park SK (2000) Regulation of phospholipase D2 by H₂O₂ in PC12 cells. *J Neurochem* 75(6):2445–2454
- Oliveira TG, Chan RB, Tian H, Laredo M, Shui G, Staniszewski A, Zhang H, Wang L, Kim TW, Duff KE, Wenk MR, Arancio O, Di Paolo G (2010) Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *J Neurosci* 30(49):16419–16428
- Payton JE, Perrin RJ, Woods WS, George JM (2004) Structural determinants of PLD2 inhibition by alpha-synuclein. *J Mol Biol* 337(4):1001–1009
- Rogasevskaia TP, Coorsen JR (2015) The role of phospholipase D in regulated exocytosis. *J Biol Chem* 290(48):28683–28696
- Rohrbough J, Broadie K (2005) Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat Rev Neurosci* 6(2):139–150
- Schwarz K, Natarajan S, Kassas N, Vitale N, Schmitz F (2011) The synaptic ribbon is a site of phosphatidic acid generation in ribbon synapses. *J Neurosci* 31(44):15996–16011
- Servitja JM, Masgrau R, Pardo R, Sarri E, Picatoste F (2000) Effects of oxidative stress on phospholipid signaling in rat cultured astrocytes and brain slices. *J Neurochem* 75(2):788–794
- Shin EY, Ma EK, Kim CK, Kwak SJ, Kim EG (2002) Src/ERK but not phospholipase D is involved in keratinocyte growth factor-stimulated secretion of matrix metalloprotease-9 and urokinase-type plasminogen activator in SNU-16 human stomach cancer cell. *J Cancer Res Clin Oncol* 128(11):596–602
- Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R (2009) Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* 460:525–528
- Stutchfield J, Cockcroft S (1993) Correlation between secretion and phospholipase D activation in differentiated HL60 cells. *Biochem J* 293(Pt3):649–655
- Sun H, Xia M, Shahane SA, Jadhav A, Austin CP, Huang R (2013) Are hERG channel blockers also phospholipidosis inducers? *Bioorg Med Chem Lett* 23(16):4587–4590
- Tabet R, Moutin E, Becker JA, Heintz D, Fouillen L, Flatter E, Krężel W, Alunni V, Koebel P, Dembélé D, Tassone F, Bardoni B, Mandel JL, Vitale N, Muller D, Le Merrer J, Moine H (2016a) Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E3619–E3628
- Tabet R, Vitale N, Moine H (2016b) Fragile X syndrome: are signaling lipids the missing culprits? *Biochimie* 130:188–194
- Tanguy E, Carmon O, Wang Q, Jeandel L, Chasserot-Golaz S, Montero-Hadjadje M, Vitale N (2016) Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J Neurochem* 137(6):904–912
- Taraska JW, Perrais D, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S, Almers W (2003) Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4):2070–2075. Epub 21 Jan 2003
- Topham MK (2006) Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J Cell Biochem* 97(3):474–484 Review
- van Kempen GT, vanderLeest HT, van den Berg RJ, Eilers P, Westerink RH (2011) Three distinct modes of exocytosis revealed by amperometry in neuroendocrine cells. *Biophys J* 100(4):968–977
- Vance DE, Goldfine H (2002) Konrad Bloch – a pioneer in cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 292(5):1117–1127
- Vance JE, Vance DE (2004) Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 82(1):113–128
- Vicogne J, Vollenweider DJR, Huang P, Frohman MA, Pessin JE (2006) Asymmetric phospholipid distribution drives in vitro reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14761–14766
- Vitale N (2010) Synthesis of fusogenic lipids through activation of phospholipase D1 by GTPases and the kinase RSK2 is required for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 38(Pt 1):167–171

- Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20(10):2424–2434
- Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bader MF (2002) Regulated secretion in chromaffin cells: an essential role for ARF6-regulated phospholipase D in the late stages of exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 971:193–200
- Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader MF, Chasserot-Golaz S (2005) The small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280(33):29921–29928
- Vodicka P, Mo S, Tousley A, Green KM, Sapp E, Iuliano M, Sadri-Vakili G, Shaffer SA, Aronin N, DiFiglia M, Kegel-Gleason KB (2015) Mass spectrometry analysis of wild-type and knock-in Q140/Q140 Huntington's disease mouse brains reveals changes in glycerophospholipids including alterations in phosphatidic acid and lyso-phosphatidic acid. *J Huntingtons Dis* 4(2):187–201
- Waselle L, Gerona RR, Vitale N, Martin TF, Bader MF, Regazzi R (2005) Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol Endocrinol* 19(12):3097–3106. Epub 4 Aug 2005
- Williams JM, Pettitt TR, Powell W, Grove J, Savage CO, Wakelam MJ et al (2007) Antineutrophil cytoplasm antibody-stimulated neutrophil adhesion depends on diacylglycerol kinase-catalyzed phosphatidic acid formation. *J Am Soc Nephrol* 18(4):1112–1120
- Xie MS, Jacobs LS, Dubyak GR (1991) Activation of phospholipase D and primary granule secretion by P2-purinergic- and chemotactic peptide-receptor agonists is induced during granulocyte differentiation of HL-60 cells. *J Clin Invest* 88:45–54
- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeblerlé AM, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader MF, Vitale N (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* 282(30):21746–21757
- Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanich ME, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader MF, Vitale N (2008) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(24):8434–8439
- Zeniou-Meyer M, Gambino F, Ammar MR, Humeau Y, Vitale N (2010) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 and neurosecretion. *Cell Mol Neurobiol* 30(8):1401–1406
- Zhang Y, Huang P, Du G, Kanaho Y, Frohman MA, Tsirka SE (2004) Increased expression of two phospholipase D isoforms during experimentally induced hippocampal mossy fiber outgrowth. *Glia* 46(1):74–83
- Zhu YB, Kang K, Zhang Y, Qi C, Li G, Yin DM, Wang Y (2012) PLD1 negatively regulates dendritic branching. *J Neurosci* 32(23):7960–7969

Article en préparation :

Fonctions de la PLD et de différentes espèces de PA durant l'exocytose régulée

I. Objectifs de l'étude

L'exocytose régulée joue un rôle fondamental dans la communication cellulaire au sein de notre organisme, en permettant entre autres la sécrétion de médiateurs tels que des neurotransmetteurs et des hormones. Alors que de nombreux acteurs protéiques de ce processus ont été caractérisés, des données relativement récentes ont révélé la contribution active de certains lipides membranaires dans l'exocytose. Parmi ceux-ci, le PA a été largement reconnu comme un puissant modulateur de la neurotransmission ([Raben et Barber, 2017](#)), ainsi que de la sécrétion neuroendocrine ([Bader et Vitale, 2009](#)). Par ailleurs, des travaux de notre équipe ont montré que la production du PA par l'enzyme PLD1 à la membrane plasmique joue un rôle crucial dans l'exocytose régulée des cellules neuroendocrines ([Zenjou-Meyer et al., 2007](#)). Au vu des propriétés de ce phospholipide, plusieurs hypothèses ont été posées afin d'expliquer les mécanismes d'action du PA (voir l'introduction générale, III.B.). Néanmoins, ces hypothèses restent relativement théoriques, puisqu'elles sont essentiellement basées sur des observations obtenues sur des modèles *in vitro*, voir des modélisations biophysiques. Par ailleurs, l'exocytose est un processus qui se déroule en plusieurs étapes successives bien distinctes, mais l'implication du PA dans ces différentes phases reste à définir. Il apparaît donc évident que la compréhension du mode de fonctionnement du PA dans l'exocytose requiert à la fois de nouvelles approches expérimentales et des études plus détaillées.

Par ailleurs, comme tout phospholipide, le PA existe sous différentes formes selon la longueur et le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras qui le composent. De manière intéressante, ces différentes espèces de PA pourraient être impliquées dans des fonctions biologiques distinctes. Ainsi, des expériences de modélisation ont permis d'établir que la structure tridimensionnelle de diverses formes de PA varie notamment en fonction du degré d'insaturation, suggérant la possibilité que des formes mono- ou polyinsaturées présentent chacune des affinités spécifiques pour des partenaires protéiques ou qu'elles affectent la topologie membranaire de manière différente ([Hodgkin et al., 1998](#)). Ces données suggèrent que le PA pourrait remplir des rôles distincts au cours de l'exocytose selon les espèces produites. Des études réalisées récemment ont permis pour la première fois d'avoir des informations quantitatives sur la composition cellulaire des différentes espèces de PA dans les cellules neurosécrétrices ([Oliveira et Di Paolo, 2010](#)). Cependant, la nature des espèces synthétisées au cours des processus de trafic membranaire comme l'exocytose n'avait pas été étudiée au moment où j'ai commencé ces travaux.

Dans ce cadre, nous avons tenté de préciser les rôles du PA produit par la PLD au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale. Afin d'identifier les étapes de l'exocytose affectées par le PA et de mieux caractériser le rôle de la PLD1, nous avons combiné des approches électrophysiologiques avec de la microscopie électronique permettant de visualiser les sites d'exocytose avec précision. Les fonctions spécifiques des différentes formes du PA ont quant à elles été abordées *via* l'association d'analyses de lipidomique réalisées sur des fractions membranaires purifiées et des expériences de restauration par des PA exogènes. Pour finir, nous avons utilisé une des sondes du PA décrites dans la première section expérimentale (Chapitre I, publication 1) afin de définir plus précisément la dynamique du PA au cours de l'exocytose et sa localisation par rapport aux sites de fusion des granules de sécrétion.

II. Résultats

Les résultats obtenus sont exposés dans le manuscrit que vous trouverez à partir de la page suivante, et que je signe en premier auteur :

Mono- and polyunsaturated phosphatidic acid regulate distinct steps of regulated exocytosis in neuroendocrine cells.

Tanguy E., Costé de Bagneaux P., Kassas N., Ammar M.-R., Wang Q., Haeberlé A.-M., Raherindratsara J., Fouillen L., Renard P.-Y., Montero M., Chasserot-Golaz S., Ory S., Gasman S., Bader M.-F. and Vitale N.

(en préparation pour une soumission à la revue PNAS)

Des résultats complémentaires à cette étude seront également présentés au cours de la discussion.

Mono- and polyunsaturated phosphatidic acid regulate distinct steps of regulated exocytosis in neuroendocrine cells

Emeline Tanguy¹, Pierre Costé de Bagneaux¹, Nawal Kassas¹, Mohamed-Raafet Ammar¹, Qili Wang¹, Anne-Marie Haeberlé¹, Juliette Raherindratsara¹, Laetitia Fouillen², Pierre-Yves Renard³, Maité Montero⁴, Sylvette Chasserot-Golaz¹, Stéphane Ory¹, Stéphane Gasman¹, Marie-France Bader¹ and Nicolas Vitale¹

¹Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France

²Laboratoire de Biogénèse Membranaire; UMR-5200 Centre National de la Recherche Scientifique, Plateforme Métabolome; Université de Bordeaux; 33883 Villenave D'Ornon, France.

³Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, 76000, Rouen, France

⁴Normandie Univ, UNIROUEN, COBRA, UMR 6014 & FR 3038, INSA Rouen, Centre National de la Recherche Scientifique, 76000 Rouen, France

Abstract

Specific forms of fatty acids are believed for a long time to have beneficial health effects, although their precise mechanism of action remains elusive. Among them, polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been proposed to prevent cognitive decline and accordingly, they have recently been described as essential partners for the core protein machinery involved in neurotransmitter release. PA synthesized by PLD1 has been described to be crucial in regulated exocytosis both in neuroendocrine cells and in neurons. Here, using pharmacological and genetic approaches in neuroendocrine cells, we investigated the role of phosphatidic acid (PA) produced by phospholipase D1 (PLD1) in the docking and fusion of secretory granules. Secretory granule and plasma membranes display a distinct composition in PA as revealed by lipidomic analysis. We identified PA species that significantly increased in the plasma membranes prepared from stimulated cells. Using a specific probe for PA, PA was found to accumulate at granule docking sites in cells stimulated for secretion, suggesting a role for PA in the course of exocytosis. Finally, rescue experiments in cells depleted of PLD1 activity reveal that monounsaturated PA contributes to granule docking while polyunsaturated PA regulates fusion pore stability and expansion. Altogether our work opens a novel comprehension of the cellular functions played by subspecies of the same phospholipid.

Significance

Despite increasing evidence that lipids play key cellular functions and are involved in an increasing number of human diseases, little information is available on their exact mechanism of action. This is especially the case for phosphatidic acid (PA) that has been shown to be involved in many normal and pathological cellular functions. PA lies in the middle of three-enzymatic pathways, which makes it an ideal signaling integrator. We show here that mono- and polyunsaturated forms of PA are involved in different steps of the neurosecretory pathway. Intriguingly the polyunsaturated form of PA appears to control the lifetime of the initial vesicular fusion pore and its expansion before full vesicular fusion, suggesting that this form of PA may contribute to one aspect of the beneficial cognitive function of PUFA by optimizing neurotransmitter release.

Introduction

Phosphatidic acid (PA) is a pleiotropic lipid playing an important structural role as a precursor of glycerophospholipids, but also considered as a key signal integrator in a variety of cellular functions (1-3). Three alternative biosynthetic pathways contribute to the production of signaling forms of PA. The first pathway involves phospholipase D (PLD), which catalyzes the hydrolysis of the distal phosphodiester bond in phosphatidylcholine (PC) to form PA and choline. The second involves diacylglycerol (DAG) kinase (DGK), which phosphorylates DAG, using ATP as a phosphate source, to produce PA. The third implicates acylation of lyso-PA (LPA) to form PA, by LPA-acyltransferases (LPAAT) (4).

PA has been involved in a variety of membrane trafficking events, including endocrine and neuroendocrine exocytosis, synaptic neurotransmission, mast cell degranulation, insulin-stimulated glucose transporter translocation, and phagocytosis (5-10). Yet, little information is still available about its dynamics and role along the secretory pathway. The diversity of the PA biosynthetic routes due to the complexity of the PLD, DGK and LPAAT families, together with the occurrence of many different PA species based on the fatty acyl chain composition opens the possibility for multiple roles in a given cellular function (11). For instance, PA is an important regulator in membrane trafficking, possibly because PA-enriched membranes tend to undergo fusion due to higher curvature, but PA might also serve for recruiting specific proteins or as an intermediate for lipid synthesis. Whether these different roles rely on specific PA subspecies remains unknown and unexplored. Given the awareness of the relevance of PA in a growing number of cellular functions and human diseases (12, 13), understanding the significance of the dynamics and roles of the diverse forms of PA is becoming an important research goal.

In the present manuscript, we use pharmacological and genetic alteration of PLD expression and activity in neuroendocrine chromaffin cells to demonstrate the physiological importance of PA synthesis for stress hormone (catecholamine) secretion (14, 15). At the cellular level, we found that PA governs different steps of the chromaffin granule secretory pathway and we identified specific PA species enriched at the plasma membrane during exocytosis. Rescue experiments in chromaffin cells depleted of PLD activity reveal the specific contribution of monounsaturated PA in the docking of secretory granules and polyunsaturated PA in the lifetime of the fusion pore in the late stages of exocytosis.

Results

Impairing PLD1 expression or activity affects exocytosis in chromaffin cells at distinct stages. We first estimated the role of the two major isoforms of mammalian PLD in catecholamine secretion using *Pld1* or *Pld2* knockout mice chromaffin cells. The physiological significance of PLD for catecholamine secretion was assessed by measuring catecholamine levels in the blood of newborn mice as a dramatic rise in adrenaline and noradrenaline levels after birth have been reported in several mammalian species including humans (16). In wild type mice (control), the blood adrenaline levels were indeed extremely high after birth but rapidly decreased afterwards (Fig. 1A). *Pld1* knockout, but not *Pld2*, largely prevented this rise short after birth of adrenaline (Fig. 1A) and noradrenaline (SI Appendix, Fig. S1), confirming that PLD1 plays an important modulatory role for catecholamine secretion during stress responses.

To investigate the role of PLD in catecholamine secretion at the cellular level, we used carbon fiber amperometry on cultured mice chromaffin cells to determine the frequency and kinetics of individual exocytotic events (17). Figure 1B shows representative amperometric traces recorded from wild type (control), *Pld1*^{-/-}, and *Pld2*^{-/-} chromaffin cells stimulated with nicotine. Whereas *Pld2* knockout had no significant effect, *Pld1* knockout decreased the frequency of the amperometric events by nearly 60%, indicating that PLD1 controls the number of secretory granules undergoing exocytosis.

Thereafter, the shape of individual amperometric spikes was analysed. Each amperometric spike is believed to represent a single granule fusion event with the surface area or quantal size being proportional to the amount of catecholamine released per granule, the spike height (amplitude) reflecting the maximal flux of catecholamine, the half-width reflecting the duration of the exocytotic event and the rise time reflecting the kinetics of the fusion pore expansion (Fig. 1C). *Pld1* knockout significantly affected some of these spike parameters, whereas *Pld2* knockout had no effect (Fig. 1C). While the quantal size of the spikes was not affected (SI Appendix, Fig. S2), the spike half-width and amplitude were modified in cells depleted in PLD1 (Fig. 1C). *Pld1*^{-/-} cells also displayed a reduced spike rise-time (SI Appendix, Fig. S2), indicating that the kinetic and duration of the exocytotic event was affected by the absence of PLD1 despite the fact that the total amount of catecholamines released per single granule was not modified.

Amperometric spikes are often preceded by a pre-spike foot (PSF) current believed to reflect the slow catecholamine release through an initial narrow fusion pore before its rapid

expansion, giving rise to the spike. *Pld1*^{-/-} chromaffin cells exhibited significantly longer PSF (Fig. 1C), but without significant modification in foot amplitude and charge (SI Appendix, Fig. S2). *Pld1* knockout similarly affected chromaffin cell secretion stimulated by a high potassium depolarizing solution (data not shown), in support for a role for PLD1 activity in the recruitment of secretory granules (number of exocytotic events) and in the late stages of exocytosis (fusion pore stability and/or enlargement for full fusion). To strengthen these findings, we also performed selective silencing of PLD1 using plasmids co-expressing silencing hairpin-RNA together with human growth hormone (GH) as a reporter for the secretory activity of transfected cells (18). Silencing of PLD1 was found to reduce by nearly two-third the secretory activity (GH release) of primary bovine chromaffin cells and rat pheochromocytoma PC12 cells (Fig. 1D).

Next, we compared the effect of genetic and pharmacological inhibition of PLD1 in chromaffin cells. Figure 1E illustrates the dose-dependent effect of the dual PLD1/PLD2 inhibitor FIPI on chromaffin cell secretion stimulated by nicotine, high-potassium depolarization or direct rise of cytoplasmic calcium by streptolysin-O (SLO)-permeabilization. FIPI induced a similar dose-dependent inhibition of catecholamine secretion triggered by the three secretagogues, indicating that PLD inhibition directly affected the intracellular calcium-dependent exocytotic machinery. PLD1 but not PLD2 is specifically required for efficient catecholamine secretion as illustrated by the use of isoform-specific inhibitors (CAY10593 for PLD1 and CAY10594 for PLD2) (Fig. 1F). Note that FIPI and CAY10593, but not CAY10594, modified amperometric spike parameters in a similar manner to that observed in *Pld1*^{-/-} chromaffin cells (SI Appendix, Fig. S3).

In neuroendocrine cells, hormone secretion is also associated with the release of various polypeptides, including chromogranins that constitutes the dense core matrix of the secretory granules (19). It is believed that only free catecholamines diffuse through the narrow initial fusion pore, whereas chromogranins requires fusion pore expansion and full collapse of secretory granules with the plasma membrane to be co-released with catecholamine (20). We examined the effect of the PLD inhibitors on chromogranin A (CgA) release (Fig. 1G). Both FIPI and CAY10593 reduced CgA secretion from cells stimulated by high-potassium depolarisation, whereas CAY10594 had no effect. These observations support the idea that PLD1 activity is required for full fusion of secretory granules with the plasma membrane to release both catecholamines and CgA.

Specific PA species are produced at the plasma membrane during chromaffin cell exocytosis. To compare the PA composition of secretory granule and plasmalemmal membranes under resting and stimulated conditions, we used rat PC12 cells to reproducibly obtain sufficient amount of material for comprehensive lipid analysis. PC12 cell secretory granules and plasma membranes were purified by subcellular fractionation on sucrose density gradients. Both granular and plasma membranes contained detectable levels of up to 40 different PA species (SI Appendix, Fig. S4). Secretory granules were particularly enriched in polyunsaturated PA forms (especially PA 40:6 containing the omega-3 docosahexaenoic (DHA) fatty acid) (SI Appendix, Fig. S4). Surprisingly, the total amount of PA present in the plasma membrane was around 12.5 ± 0.8 nmol/mg of protein, while the amount of PA found in secretory granule membranes was around 36.3 ± 1.1 nmol/mg of protein, and this excess was largely due to the polyunsaturated PAs including PA 40:6. Stimulation with high-potassium decreased the total amount of secretory granules in PC12 cells by ~25%, but the total level of PA per protein as well as the ratio of individual PA species in granule membranes were not significantly modified (data not shown). In contrast, K^+ stimulation increased the level of PA found in the plasma membrane, by more than 6 fold compared to resting cells, to reach 76.5 ± 1.2 nmol/mg of protein. This increase of PA in the plasma membrane upon cell stimulation largely relied on PA containing long chain mono- and diunsaturated fatty acids (PA 36:1, 38:1 and 38:2) although several polyunsaturated PA species including DHA-containing forms were also found in large amounts (Fig. 2A and SI Appendix, Fig. S5).

To visualize the precise distribution of PA at the docking site, we prepared native plasma membrane sheets (21) from resting or stimulated cells expressing the PA sensor Spo20p-GFP (18). When expressed in chromaffin cells, Spo20p-GFP is efficiently recruited to the plasma membrane upon nicotine or high- K^+ stimulation, whereas the Spo20p-GFP mutant displaying reduced affinity for PA is not (SI Appendix, Fig. S6), in agreement with our lipidomic observations that secretagogues trigger an increase in plasma membrane PA level. As illustrated in Figure 2B by immunogold electron microscopy, native plasma membrane sheets prepared from resting cells displayed only very few gold particles revealing the presence of Spo20p-GFP in most cases found in the close vicinity of docked granules (Fig. 2B). Cell stimulation increased the number of docked secretory granules (Fig. 2B), but also the amount of gold particles found at the plasma membrane close to docked secretory granules (Fig. 2B). Numerical analysis of particle distribution relative to the granule docking site showed that nearly one third of the PA sensor was detected below the secretory granules, while a second

third was concentrated in a 50 nm zone from the edge of the granules and the last third was found equally more distantly distributed (Fig. 2C). Note that most of the gold particles that were not found below the granules appeared to be closely associated with filamentous actin structures anchoring secretory granules to the plasma membrane (21) (Fig. 2B, 2C). It is also worth to mention that our analysis most likely minimizes the amount of Spo20p-GFP detected below the secretory granules as gold particles were only seen by transparency in granules that have already at least partially released their content. To assess the specificity of the detection, control experiments were performed with chromaffin cells expressing GFP alone (Fig. 2B). Altogether, these findings reveal that various PA species are produced in chromaffin cells undergoing exocytosis both on actin anchors stabilizing docked granules and also below granules potentially close to the fusion pore.

Distinct PA species rescue different steps of regulated exocytosis. Based on pioneer studies from Amatore et al. (2006) (22) showing the effect on secretion of lipid provision, we decided to undertake rescue experiments to identify the function of individual PA species in exocytosis. We first set up experimental conditions to probe that addition of exogenous PA could reach the inner leaflet of the plasma membrane using chromaffin cells expressing Spo20p-GFP. When a mixture of egg-PA or individual forms of PA were added to the medium of cultured chromaffin cells, Spo20p-GFP was rapidly recruited to the plasma membrane whereas a mutated form of the sensor remained in the nucleus (SI Appendix, Fig. S6). Note that the levels of Spo20p-GFP at the plasma membrane after exogenous PA provision was very similar to those observed after nicotine or high-potassium stimulation (SI Appendix, Fig. S6), suggesting that under our experimental conditions, provision of exogenous PA might increase the plasma membrane PA to levels similar to those reached in stimulated cells.

Incubation of chromaffin cells with increasing amounts of a PA mixture did not significantly affect secretion (Fig. 3A). However, it largely rescued the inhibition of secretion induced by the PLD1 inhibitor CAY10593 (Fig. 3A) and FIPI (Fig. 3B). Additionally, mono- (PA 36:1) and di- (PA 36:2) unsaturated forms of PA also rescued the inhibitory effect of FIPI on secretion, whereas polyunsaturated PA 40:6 had little effect (Fig. 3B). Note that PA 44:12, a form containing two DHA fatty acid chains and that was not found in our lipidomic analysis, had also no rescue effect on secretion (Fig. 3B). The effects of exogenous PA on individual granule exocytosis was further analyzed by amperometry (Fig. 3C). Provision of a mixture of PA in the cell incubation medium rescued the number of exocytotic events (spikes) and the

individual spike parameters in chromaffin cells having PLD1/PLD2 inhibited by FIPI (Fig. 3C). Mono- and diunsaturated forms of PA (PA 36:1 and PA 36:2) were able by themselves to rescue the number of exocytotic events, whereas saturated (data not shown) or polyunsaturated forms of PA (PA 40:6, PA 44:12) were ineffective (Fig. 3C). However, despite restoring the number of spikes per cell, mono- and diunsaturated forms of PA (PA 36:1 and PA 36:2) could not prevent FIPI from increasing spike half width and foot duration, whereas the omega-3 form of PA (PA 40:6) specifically rescued these kinetic parameters (Fig. 3C). In other words, the various stages underlying catecholamine secretion i.e. granule docking and subsequent fusion pore formation and/or enlargement seem to implicate distinct PA species.

Monounsaturated PA is involved in secretory granule docking. Figure 4A presents the effect of *Pld1* and *Pld2* knockout on the 10 most abundant PA species detected in the adrenal gland from wild type, *Pld1*^{-/-}, and *Pld2*^{-/-} mice. In agreement with previous analysis performed on mouse brain (23), *Pld2* knockout did not induce important modifications in the level of the various PA species (Fig. 4A). In contrast, *Pld1* knockout had a much more profound effect on many PA species (Fig. 4A). Notably the PA containing long mono- and diunsaturated fatty acids (PA 36:1 and PA 36:2), presumably implicated from the amperometry experiments in the number of release events, were reduced by nearly 50% in *Pld1*^{-/-} mice (Fig. 4A). We then performed electron microscopy and morphometric analysis on slices from adrenal gland to estimate the number of secretory granules visually considered as docked at the plasma membrane. As illustrated in Figure 4B, *Pld1* knockout reduced the number of docked granules by nearly 50%, in good correlation with the reduction in the number of secretory events seen by amperometry in *Pld1*^{-/-} (Fig. 1B) or FIPI treated (Fig. 3C) chromaffin cells. Finally, we examined native plasma membrane sheets prepared from unstimulated or high-K⁺ stimulated chromaffin cells. PLD inhibition by FIPI treatment reduced the number of secretory granules found attached to the inner face of the plasma membrane in high-potassium stimulated cells (Fig. 4C). Incubation of cells with a PA mixture almost completely prevented this inhibitory effect of FIPI on granule docking (Fig. 4C). Most interestingly, the monounsaturated PA 36:1 also significantly restored the number of docked granules in stimulated PLD-depleted chromaffin cells whereas the omega-3 form PA 40:6 was without effect. Similar observations were obtained from immunostaining of extracellular dopamine β-hydroxylase (DBH), a granular enzyme which becomes accessible to external antibodies after granule fusion to the plasma membrane. FIPI treatment reduces the number of fusion sites, which can be rescued

by incubation with PA 36:1, confirming that the lack of docked granules is not due to an increase in the fusion process (SI Appendix, Fig. S7A,C).

Altogether, our findings support the idea that docking of secretory granules requires mono- (and probably di-) unsaturated forms of PA whereas polyunsaturated omega-3 PA 40:6 most likely contributes to the late fusion stages of exocytosis.

Discussion

Important progress in understanding the molecular mechanisms of secretion including hormonal and neurotransmitter release has been made through the discovery of the minimal protein machinery needed for fusion (24), but many regulatory aspects of vesicle release remain elusive (25). For instance there is increasing evidence that lipids play key cellular functions and are involved in many human diseases where secretion is altered but still little information is available on their exact contribution to secretion (26, 27). This is especially the case for phosphatidic acid (PA) that lies in the middle of three-enzymatic pathways, which makes it an ideal signaling integrator (4). Like all phospholipids, PA comes in different flavor based on its fatty acyl chain composition with up to 40 PA species found in mammals, offering to the same lipid family the possibility to support multiple functions. We show here for the first time that PLD1 activity promotes the synthesis of distinct PA species found in the close vicinity of the exocytotic sites and demonstrate that mono- and diunsaturated PA contribute to regulate secretory docking and thereby the number of secretory events, while the omega-3 polyunsaturated PA regulates fusion pore dynamics thereby potentially modulating the type and/or amount of molecules released per vesicle.

The observation that different forms of PA seem to be involved in distinct stages along the secretory pathway suggests that these effects might involve different targets. PA can recruit and/or activate specific proteins to particular membrane locations (8). Among the nearly 50 different proteins that have been shown to date to bind to PA (8), several ones are interesting candidates in regulating exocytosis. For instance, the SNARE protein syntaxin-1 has been shown to bind to several anionic lipids including phosphoinositides and PA (28). *In vitro* experiments support the idea that PA directly affects SNARE complex assembly and/or zippering (29), although the function of the different PA forms has not been yet tested. Interestingly, mutations in the polybasic site abolishing the ability of syntaxin 1 to bind PA resulted in a reduction of the number of amperometric spikes and an increase in the PSF duration (28), very similarly to the amperometric response obtained in *Pld1*^{-/-} chromaffin cells

or in cells with inhibited PLD activity. The cytoskeleton that plays a chief role in regulated exocytosis is also a major potential target of PA. Several actin-binding proteins have been shown to bind directly to PA, including small GTPases of the Rho family, which are key conductors of the cytoskeleton dynamics (4, 8). We found that PLD inhibition by FIPI treatment did not affect cortical actin depolymerization required for neuroendocrine secretion (SI Appendix, Fig. S7), but PA might modulate other subtle actin rearrangements that have been observed during exocytosis (21). For instance, annexin-A2, which binds to anionic lipids including PA, was recently shown to promote actin bundling required for efficient granule fusion (30). Of interest, we show here (Fig. 2) that the PA sensor Spo20p-GFP is found closely associated to the large annexin A2-mediated actin bundles that anchor secretory granules to the plasma membrane in stimulated chromaffin cells (21). Finally PA may also act as a lipid second messenger as it is an important regulator of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) synthesis, another crucial lipid in particular for the priming steps of exocytosis (31).

The observation that the omega-3 form of PA specifically regulates the late stages of exocytosis, most likely the fusion pore formation and dynamics, expands our knowledge on the key cellular function of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in neurons or neuroendocrine cells. Indeed, it is well admitted that a high PUFA diet has cognitive beneficial effects, but the underlying cellular mechanisms remain elusive (32). A first hint came from the observation that secretory and synaptic vesicles are particularly enriched in PUFA (33). More recently, it was shown by various biophysical and cellular assays that PUFA increase the ability of dynamin and endophilin to deform membranes and support endocytosis, as compared to monounsaturated fatty acids (MUFA) (34). Due to the higher flexibility of their acyl chain, PUFA adapt their conformation to membrane curvature, thereby reducing the energetic cost of various membrane deformations and facilitating fission or fusion events (35). Furthermore the effect of PUFA on membrane packing is actually less disturbing than that of MUFA and phospholipids containing PUFA might soften various molecular stresses in the hydrophobic core of the membrane (36). PA is a cone-shaped lipid that is likely to modulate membrane topology by accumulating at curved membrane areas, resulting in the merging of the inner leaflet of the plasma membrane and the outer leaflet of the vesicular membrane, particularly in the presence of calcium (37). Thus, in the course of exocytosis, synthesis of PA containing a PUFA side chain might well regulate the dynamics of the fusion pore but also the formation of compensatory endocytic vesicles after full collapse of secretory granules in the plasma membrane. Interestingly, we observed on plasma membrane sheets a pool of PA distributed

below the granules after stimulation, that could be involved on fusion or compensatory endocytosis rather than docking step.

One of the more exciting developments in understanding neuronal synaptic function has been the increasing interest in the role of lipids and among them PA appears to play a prominent role (38). We are only at the verge to fully appreciate the functional interconnection in neuronal function between PA, PIP₂, and DAG all tightly intertwined in their multiple metabolic pathways (39). For instance, alteration of the tight PA/DAG equilibrium in neurons might be one of the main sources for the neuronal dysfunction in the Fragile-X disease (40), whereas PA synthesis was reported to be altered in the Coffin Lowry Syndrome, an intellectual disability disease (41), as well as in Alzheimer disease (23). The function of individual PA species in these pathologies remain however to be precisely established, but the possibility seen here to restore exocytosis by provision of the adequate PA to cells opens for a better understanding of the role of specific fatty acids in diet to improve human health.

Materials and Methods

Ethics Statement and Mouse Lines. The *Pld1*^{-/-} and *Pld2*^{-/-} mouse lines were described previously (42, 43). They were housed and raised at Chronobiotron UMS 3415. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24th November 1986 (86/609/EEC) and resulting French regulations. Accordingly the CREMEAS local ethical committee approved all experimental protocols. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

Reagents and Plasmids. FIPI, CAY10593, CAY10594 were purchased from Cayman Chemicals. Lipids were obtained from Avanti Polar Lipids. Sequences used for the silencing experiments were described and validated previously (18). Anti-CgA antibodies were described previously (44).

Culture of Chromaffin and PC12 Cells. Bovine and mouse chromaffin cells were isolated as previously described (45, 46). PC12 cells were cultured as described previously (47). See SI Appendix, Supplemental Materials and Methods for details.

Transfection. PC12 cells were transfected at 50-70% confluence with the indicated plasmids using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Thermo Scientific) as described previously (47). Bovine chromaffin cells were electroporated (Amaxa Nucleofactor systems, Lonza, Levallois, France) as described previously (17).

Amperometry. Mice or bovine chromaffin cells were washed with Locke's solution and processed for catecholamine release measurements by carbon fiber amperometry after stimulation by 10 seconds pressure ejection of 100 mM K⁺ solution or 100 μM nicotine solution from a micropipette positioned at 30 μm from the cell and recorded during 60 seconds as described previously (17, 21). See SI Appendix, Supplemental Materials and Methods for details.

Secretion and catecholamine Elisa assays. Details for catecholamine and GH secretion assays can be found in SI Appendix, Supplemental Materials and Methods. Catecholamine levels from blood samples were measured using the 3-CAT research Elisa kit from LDN (Eurobio, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions.

Subcellular fractionation and PA lipidomic analysis. 400×10^6 PC12 cells grown in 100-mm plates were washed twice with Locke's solution and then incubated for 10 min with Locke's solution (basal release) or stimulated with a 59 mM K^+ solution. Medium was removed and cells immediately scrapped in 1 ml of sucrose 0.32 M (20 mM Tris pH 8.0). Cells were broken before plasma and secretory granule membranes were purified essentially as described previously (47). Adrenal glands were dissected from wild-type, *Pld1*^{-/-} and *Pld2*^{-/-} mouse, weighted, cut into small piece and mixed in 200 μ L of sucrose 0.32 M (20 mM Tris pH 8.0). Total lipids were extracted by the method of Bligh & Dyer (48) before lipidomic analysis. Organic phase of lipid extracts were analysed by mass spectrometry essentially as described previously (11, 40). See SI Appendix, Supplemental Materials and Methods for details.

Transmission electron microscopy of chromaffin cells *in situ* and secretory granule docking analysis. Wild-type, *Pld1*^{-/-} and *Pld2*^{-/-} mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and transcardiacally perfused with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, containing 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde. The 2-mm-thick slices were cut from the adrenal glands and postfixated in 1% glutaraldehyde in phosphate buffer overnight at 4°C. The slices were then immersed for 1h in OsO₄ 0.5% in phosphate buffer. 1 mm³ blocks were cut in the adrenal medulla, dehydrated, and processed classically for embedding in Araldite and ultramicrotomy. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and examined with a Hitachi 7500 transmission electron microscope. Secretory granules were counted in 50 chromaffin cells from WT, *Pld1*^{-/-}, and *Pld2*^{-/-} mice each with a visible nucleus randomly selected in ultrathin sections from several blocks (1 section/block) from each mouse and were considered to be docked when being less than 50 nm from the plasma membrane.

Plasma membrane sheet preparation, immunolabeling and transmission electron microscopy. Cytoplasmic face-up membrane sheets were prepared and processed as previously described (21). Cells expressing Spo20p-GFP were used <20h after transfection. After blocking in PBS with 1% BSA and 1% acetylated BSA, the immunolabeling was performed and revealed with 15 nm gold particle-conjugated secondary antibodies. Membrane sheets were observed using a Hitachi 7500 transmission electron microscope. The

number of granules and distances were determined manually using Adobe Photoshop. See SI Appendix, Supplemental Materials and Methods for details.

Data Collection and Statistical Analysis. Data were analyzed using SigmaPlot 10 software. In the figure legends, *n* represents the number of experiments or the number of cells analyzed as specified. Statistical significance has been assessed using *t*-test or the Mann-Whitney test when data did not fulfill requirements for parametric tests.

Acknowledgements

We acknowledge the confocal microscopy facilities of Plateforme Imagerie In Vitro, the cytometry facility at INCI, the municipal slaughterhouse of Haguenau (France) for providing the bovine adrenal glands. This work was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale to N.V.

Author contribution statement

Experiments were performed and analysed by E.T., P.C.B., N.K., M.-R.A., Q.W., A.-M.H., J.R., and L.F. Images analysis was performed by E.T., P.C.B and Q.W. with the help of S.C.-G. and S.O. whereas D.H. and L.F. were involved in the lipidomics. P.-Y.R., M.M., S.G., M.-F.B. and N.V. designed experiments and discuss the evolving project. N.V. wrote the manuscript and provided financial grant support. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Tanguy E, Wang Q, Moine H, Vitale N (2019) Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13. doi:10.3389/fncel.2019.00002.
2. Zegarłinska J, Piaścik M, Sikorski AF, Czogalla A (2018) Phosphatidic acid – a simple phospholipid with multiple faces. *Acta Biochimica Polonica* 65(2):163–171.
3. Pokotylo I, Kravets V, Martinec J, Ruelland E (2018) The phosphatidic acid paradox: Too many actions for one molecule class? Lessons from plants. *Progress in Lipid Research* 71:43–53.
4. Ammar M-R, Kassas N, Bader M-F, Vitale N (2014) Phosphatidic acid in neuronal development: A node for membrane and cytoskeleton rearrangements. *Biochimie* 107:51–57.
5. Bader M-F, Vitale N (2009) Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta*.1791(9):936-41.
6. Ammar MR, Kassas N, Chasserot-Golaz S, Bader M-F, Vitale N (2013) Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Frontiers in Endocrinology* 4. doi:10.3389/fendo.2013.00125.
7. Barber CN, Haganir RL, Raben DM (2018) Phosphatidic acid-producing enzymes regulating the synaptic vesicle cycle: Role for PLD? *Advances in Biological Regulation* 67:141–147.
8. Tanguy E, Wang Q, Vitale N (2018) Role of Phospholipase D-Derived Phosphatidic Acid in Regulated Exocytosis and Neurological Disease (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg). doi:10.1007/164_2018_180.
9. Caumont A-S, Galas M-C, Vitale N, Aunis D, Bader M-F (1998) Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *Journal of Biological Chemistry* 273(3):1373-9.
10. Vitale N (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *The EMBO Journal* 20(10):2424–2434.
11. Kassas N, et al. (2017) Comparative Characterization of Phosphatidic Acid Sensors and Their Localization during Frustrated Phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 292(10):4266–4279.
12. Nelson RK, Frohman MA (2015) Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *Journal of Lipid Research* 56(12):2229–2237.
13. Di Paolo G, Kim T-W (2011) Linking lipids to Alzheimer’s disease: cholesterol and beyond. *Nature Reviews Neuroscience* 12(5):284–296.
14. Niedergang F, Gasman S, Vitale N, Desnos C, Lamaze C (2017) Meeting after meeting: 20 years of discoveries by the members of the Exocytosis-Endocytosis Club: 20 years of discoveries by Exocytosis-Endocytosis Club. *Biology of the Cell* 109(9):339–353.

15. Gasman S, Vitale N (2017) Lipid remodelling in neuroendocrine secretion: Lipid remodelling in neuroendocrine secretion. *Biology of the Cell* 109(11):381–390.
16. Slotkin TA, Seidler FJ (1988) Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn: secretory mechanisms and their role in stress and survival. *Journal of developmental physiology* 10(1):1-16.
17. Poëa-Guyon S, et al. (2013) The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery. *The Journal of Cell Biology* 203(2):283–298.
18. Zeniou-Meyer M, et al. (2007) Phospholipase D1 Production of Phosphatidic Acid at the Plasma Membrane Promotes Exocytosis of Large Dense-core Granules at a Late Stage. *Journal of Biological Chemistry* 282(30):21746–21757.
19. Kim T, Tao-Cheng J-H, Eiden LE, Loh YP (2001) Chromogranin A, an “On/Off” Switch Controlling Dense-Core Secretory Granule Biogenesis. *Cell* 106(4):499–509.
20. Estévez-Herrera J, González-Santana A, Baz-Dávila R, Machado JD, Borges R (2016) The intravesicular cocktail and its role in the regulation of exocytosis. *Journal of Neurochemistry* 137(6):897–903.
21. Gabel M, et al. (2015) Annexin A2–dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *The Journal of Cell Biology* 210(5):785–800.
22. Amatore C, et al. (2006) Regulation of Exocytosis in Chromaffin Cells by Trans-Insertion of Lysophosphatidylcholine and Arachidonic Acid into the Outer Leaflet of the Cell Membrane. *ChemBioChem* 7(12):1998–2003.
23. Oliveira TG, et al. (2010) Phospholipase D2 Ablation Ameliorates Alzheimer’s Disease-Linked Synaptic Dysfunction and Cognitive Deficits. *Journal of Neuroscience* 30(49):16419–16428.
24. Rizo J, Xu J (2015) The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annual Review of Biophysics* 44(1):339–367.
25. Tanguy E, et al. (2016) Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *Journal of Neurochemistry* 137(6):904–912.
26. Lauwers E, Goodchild R, Verstreken P (2016) Membrane Lipids in Presynaptic Function and Disease. *Neuron* 90(1):11–25.
27. Chasserot-Golaz S, Coorsen JR, Meunier FA, Vitale N (2010) Lipid Dynamics in Exocytosis. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(8):1335–1342.
28. Lam AD, Tryoen-Toth P, Tsai B, Vitale N, Stuenkel EL (2008) SNARE-catalyzed Fusion Events Are Regulated by Syntaxin1A–Lipid Interactions. *Molecular Biology of the Cell* 19(2):485–497.
29. Mima J, Wickner W (2009) Complex Lipid Requirements for SNARE- and SNARE Chaperone-dependent Membrane Fusion. *Journal of Biological Chemistry* 284(40):27114–27122.

30. Gabel M, et al. (2019) Phosphorylation cycling of Annexin A2 Tyr23 is critical for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866(7):1207–1217.
31. Davletov B, Montecucco C (2010) Lipid function at synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 20(5):543–549.
32. Thomas MH, Pelleieux S, Vitale N, Olivier JL (2016) Dietary arachidonic acid as a risk factor for age-associated neurodegenerative diseases: Potential mechanisms. *Biochimie* 130:168–177.
33. Takamori S, et al. (2006) Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* 127(4):831–846.
34. Pinot M, et al. (2014) Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* 345(6197):693–697.
35. Manni MM, et al. (2018) Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage. *eLife* 7. doi:10.7554/eLife.34394.
36. Barelli H, Antony B (2016) Lipid unsaturation and organelle dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 41:25–32.
37. Jouhet J (2013) Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00494.
38. Raben DM, Barber CN (2017) Phosphatidic acid and neurotransmission. *Advances in Biological Regulation* 63:15–21.
39. Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443(7112):651–7.
40. Tabet R, et al. (2016) Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(26):E3619–E3628.
41. Zeniou-Meyer M, et al. (2008) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(24):8434–8439.
42. Ammar MR, et al. (2015) PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Scientific Reports* 5(1). doi:10.1038/srep14778.
43. Ammar M-R, et al. (2013) The Coffin-Lowry Syndrome-Associated Protein RSK2 Regulates Neurite Outgrowth through Phosphorylation of Phospholipase D1 (PLD1) and Synthesis of Phosphatidic Acid. *Journal of Neuroscience* 33(50):19470–19479.
44. Chasserot-Golaz S (1996) Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *The Journal of Cell Biology* 133(6):1217–1236.

45. Vitale N, Mukai H, Rouot B, Thiersé D, Aunis D, Bader M-F (1993) Exocytosis in chromaffin cells. Possible involvement of the heterotrimeric GTP-binding protein G(o). *Journal of Biological Chemistry* 268(20):14715-23.
46. Houy S, et al. (2015) Oligophrenin-1 Connects Exocytotic Fusion to Compensatory Endocytosis in Neuroendocrine Cells. *Journal of Neuroscience* 35(31):11045–11055.
47. Vitale N, et al. (2002) Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* 159(1):79–89.
48. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37(8):911-7.

Supplemental Method section

Primary Culture of Chromaffin and PC12 Cells. Bovine chromaffin cells were isolated from fresh bovine adrenal glands by retrograde perfusion with collagenase, purified on self-generating Percoll gradients and maintained in culture. To induce exocytosis, intact chromaffin cells were washed twice with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, 0.01 mM EDTA and 15 mM Hepes, pH 7.5), and then stimulated with Locke's solution containing 20 μM nicotine or depolarising solution, K⁺ 59mM. Exocytosis from permeabilized cells was performed as described previously (Vitale et al., 1994). Mouse adrenal glands from 8 to 12-week-old males were dissected and chromaffin cells purified from papain-digested medulla. Cells were seeded on collagen-coated coverslips and maintained at 37°C, 5% CO₂ for 24 to 48 h before experiments. PC12 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with glucose (4500 mg/liter) and containing 30 mM NaHCO₃, 5% fetal bovine serum, 10% horse serum, and 100 units/ml penicillin/streptomycin and 100 μg/ml Kanamycine.

Amperometry. Mice or bovine chromaffin cells were washed with Locke's solution and processed for catecholamine release measurements by amperometry. Carbon-fiber electrode of 5 μm diameter (ALA Scientific) was held at a potential of +650 mV compared with the reference electrode (Ag/AgCl) and approached closely to GFP expressing cells. Catecholamine's secretion was induced by 10 seconds pressure ejection of 100 μM nicotine in Locke's solution or 100 mM K⁺ solution from a micropipette positioned at 20 μm from the cell and recorded during 60 seconds. Amperometric recordings were performed with an AMU130 (Radiometer Analytical) amplifier, sampled at 5 kHz, and digitally low-passed filtered at 1 kHz. Analysis of amperometric recordings was done with a macro (obtained from Dr. R. Borges laboratory; <http://webpages.ull.es/users/rborges/>) written for Igor software (Wavemetrics), allowing automatic spike detection and extraction of spike parameters. The number of amperometric spikes was counted as the total number of spikes with an amplitude >5 pA within 60 seconds. The spike parameters analysis was restricted to spikes with amplitudes of 5 pA. Quantal size (Q) of individual spike is measured by calculating the spike area above the baseline. For foot-signal, the analysis was restricted to spikes with foot amplitudes of 1.5 pA.

Catecholamine, GH, and CgA secretion assays. Chromaffin cells maintained in 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, France) were briefly washed twice with Locke and processed as stated in the figure legends. Aliquots of the medium were collected at the end of each experiment and cells were lysed with 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma, UK). Both sets of samples were assayed fluorimetrically for catecholamine content. Briefly, 20 μ l of sample were transferred to 96-well black-plates (Thermo Fisher Scientific, France), 150 μ l of CH_3COONa (1M, pH 6) and 15 μ l of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0.25%) were added to each well to oxidize catecholamines to adrenochrome. Next 50 μ l of NaOH (5M) containing ascorbic acid (0.3 mg/ml) were added, to convert adrenochrome to adrenolutin. The fluorescence emitted by adrenolutin (λ_{ex} : 430 nm, λ_{em} : 520 nm) is measured with a spectrofluorometer (LB940 Mithras, Berthold). For each experiment a standard curve was determined using known concentration of adrenaline and noradrenaline to demonstrate that the values obtained were in the linear range of detection of the assay. Amounts released were expressed as a percentage of the total amount of catecholamine present in the cells. Plotted data are representative of at least three independent experiments, each carried out in triplicate. PC12 cells (24-well plates, 80% confluent) were transfected with the various siRNA using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogene). 72 h after transfection, cells were washed four times with Locke's solution and then incubated for 10 min in Locke's solution (basal release) or stimulated for 10 min with a depolarizing concentration of K^+ . Supernatants were collected and the cells were harvested by scrapping in 10mM phosphate buffered saline (cells were broken by three freeze and thaw cycles). The amounts of GH secreted into the medium or retained within the cells were measured using an ELISA assay (Roche Applied Science). GH secretion is expressed as a percentage of total GH present in the cells before stimulation. Total amount of GH present in cells prior to stimulation was not significantly different in the different condition tested. For CgA secretion assay bovine chromaffin cells were cultured in 24-wells plate for 48-72 hr and then incubated for 60 min with the indicated PLD inhibitors, prior to stimulation in the presence or absence of the PLD inhibitors. 50 μ L supernatants were collected and added to 10 μ L of 10 x Laemmli buffer. 15 μ L aliquots were run on 4-12% Bis-Tris PAGE and CgA detected by Western blot using a rabbit CgA antibody at 1/5000 dilution followed by an anti-rabbit-HRP antibody at 1/50000 dilution and revealed.

Subcellular fractionation. 400 x 10⁶ PC12 cells grown in 100-mm plates were washed twice with Locke's solution and then incubated for 10 min with Locke's solution (basal release) or stimulated with an elevated K^+ solution. Medium was removed and cells immediately

scrapped in 1 ml of sucrose 0.32 M (20 mM Tris pH 8.0). Cells were broken and plasma and secretory granule membranes were collected in a Dounce homogenizer and centrifuged at 800 x g for 15 min. The supernatant was further centrifuged at 20 000 x g for 20 min. The resulting supernatant was further centrifuged for 60 min at 100 000 x g to obtain the cytosol (supernatant) and microsomes (pellet enriched in endosomes). The 20 000 x g pellet containing the crude membrane fraction was resuspended in sucrose 0.32 M (20 mM Tris pH 8.0), layered on a cushion sucrose density gradient (sucrose 1-1.6 M, 20 mM Tris pH 8.0) and centrifuged for 90 min at 100 000 x g to separate the plasma membrane from secretory granules. The upper fractions containing SNAP-25 (plasma membrane marker) and the pellet containing dopamine- β -hydroxylase (secretory granule markers) were collected and resuspended before lipid extraction.

PA lipidomic analysis. Total lipids from cell samples were extracted by the method of Bligh & Dyer (35). Extracts were mixed with chloroform:methanol (4:1), vortexed for 10 sec and left under agitation for 1 hr at 4°C. After a 5 min centrifugation at 13,000 rpm, the organic phase (150 μ L) was recovered and analyzed by mass spectrometry (UPLC/MS/MS) on an Acquity UPLC system Waters corp. (Milford, USA) coupled to a Quattro Premier XE triple Quadrupole MS system Waters Micromass. The sample (3 μ L) was injected into an Acquity UPLC BEH HILIC Amide precolumn (2.1 mm x 5 mm, 1.7 μ m particle size), coupled to a Waters Acquity UPLC BEH Amide column (2.1 mm x 100 mm, 1.7 μ m particle size) and maintained at 28°C. The column was eluted with a mix of acetonitrile 99.5%, ammonium hydroxide 0.5% (A) and acetonitrile 80%, water 19.5%, ammonium hydroxide 0.5% (B). The flow rate was 0.4 mL.min⁻¹ using the following elution protocol: 93% A for 2 min, followed by the gradient, 93% A to 60% A in 1 min, 60% A to 50% A in 0.5 min, 50% A to 40% A in 1.5 min. The composition of the mobile phase was then returned to initial conditions as follows: 40% A to 50% A in 2 min, 50% A to 80% A in 2.5 min, 80% A to 93% A in 0.5 min and maintained in 93% A for 2 min. UV spectra were recorded from 200 to 500 nm. The system was run by Mass-Lynx software (version 4.0). The ESI source was used in positive and negative mode with a capillary voltage 3.4 kV; RF lens at 0 V, resolution (LM1, HM1, LM2, HM2) 15, ion energy 1 and 2:0.5. Source and desolvation temperatures were 135 and 400°C. Flows rates of nitrogen for nebulizer and desolvation were 50 and 900 L.h⁻¹. Pressure of the argon collision gas was 3.0 * 10⁻³ mbar. Full-scan, Selected Ion Recording and Daughter Scan mode were used for qualitative analyses. Quantitative PA analyses were made based on MS/MS Multiple Reaction Monitoring (MRM). Briefly, MRM transitions for

individual PAs were determined using PA standards (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). The PAs were identified as deprotonated parent ions [M-H]⁻, cone energy was optimised for each PA and set to 44 V. The predominant daughter fragment ions were then used for quantitative MRM analysis. After optimisation, the collision energy was set to 44V. MRM transitions and specific retention times were used to selectively monitor PA.

Plasma membrane sheet preparation and scanning for electronic microscopy. Carbon-coated Formvar films on nickel electron grids were spilled on unstimulated or nicotine-stimulated chromaffin cells. To prepare membrane sheets, a pressure was applied to the grids for 20 s then grids were lifted so that the fragments of the upper cell surface adhered to the grid. These fragments were fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min at 4°C immediately after cell stimulation and sheet preparation, which required less than 30 s. After blocking in PBS with 1% BSA and 1% acetylated BSA, the immune labelling was performed and revealed with 25 nm gold particles-conjugated secondary antibodies. These membrane sheets were fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS, postfixated with 0.5% OsO₄, dehydrated in a graded ethanol series, treated with hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), air-dried and observed using a Hitachi 7500 transmission electron microscope.

Confocal microscopy. For immunocytochemistry, chromaffin cells grown on fibronectin-coated glass coverslips were fixed and labelled. Labelled cells were visualised using a Leica SP5II confocal microscope. The amount of Spo20p-GFP labelling associated with the plasma membrane and nucleus were measured using ROI of equivalent size with ICY software and expressed as the ratio of fluorescence intensity at the plasma membrane and the nucleus.

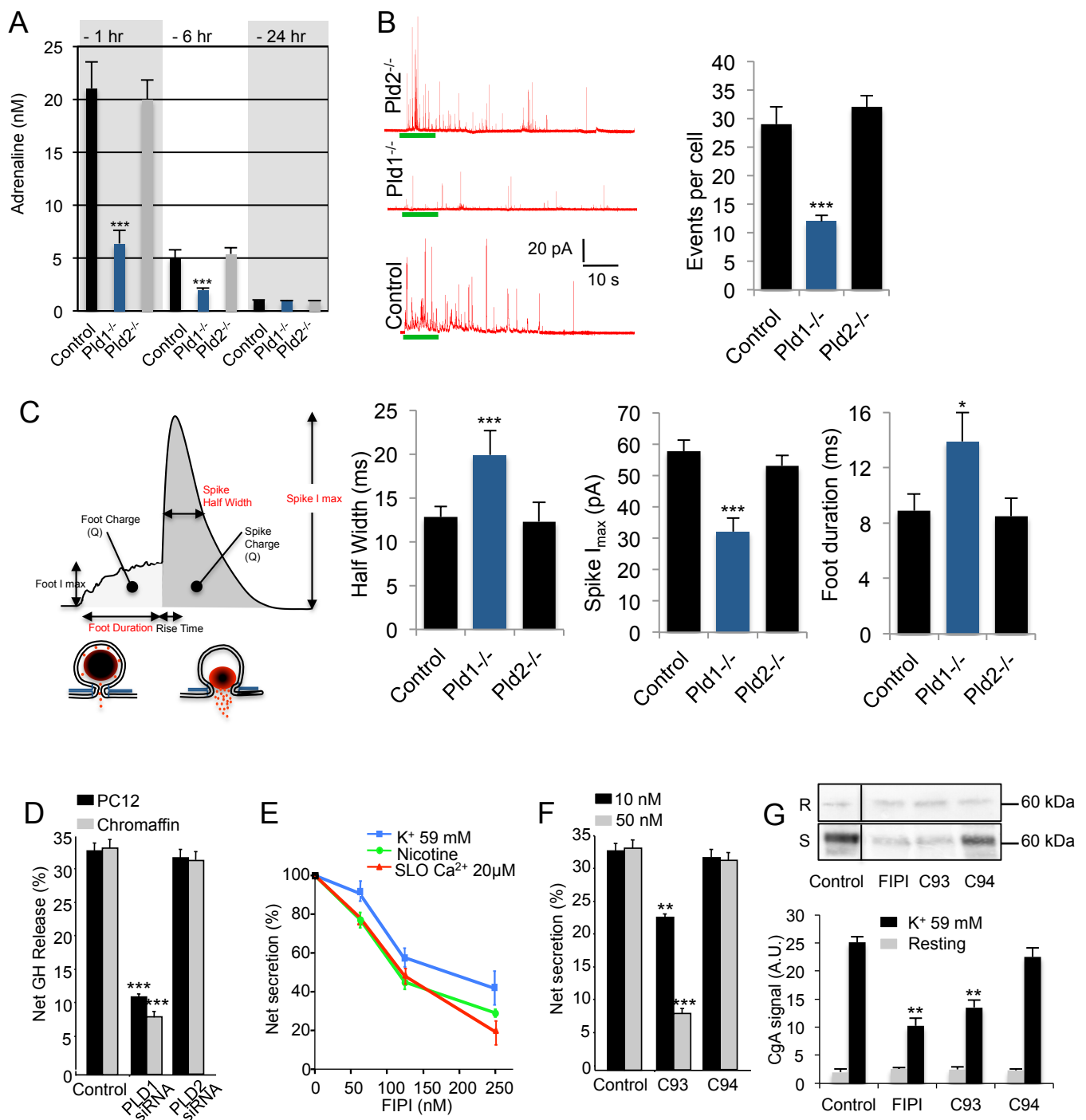


Figure 1: PLD1 activity is required for catecholamine and chromogranin A secretion. A) Adrenaline levels were measured from blood of new-born wild-type (Control), *Pld1*^{-/-} or *Pld2*^{-/-} mice 1 hour (1 hr), 6 hours (6 hr) or 24 hours (24 hr) after birth. Data are expressed as means ± S.D. (n > 9, *** p<0.001). **B-C)** Chromaffin cells in culture were stimulated with a local application of 100 µM of nicotine for 10 s (green bars) and catecholamine secretion was monitored using carbon fiber amperometry. **B)** Typical amperometric recordings obtained from wild-type (Control), *Pld1*^{-/-}, or *Pld2*^{-/-} mice chromaffin cells. The histogram illustrates the number of amperometric spikes recorded per cell. **C)** Schema showing the different parameters of the amperometric spike. In red, the three parameters affected in *Pld1*^{-/-} cells namely spike half width, amplitude I max and foot duration. Data are expressed as means ± S.D. (n > 100 cells for each condition from four independent cell cultures).

D) PC12 or chromaffin cells co-expressing GH and the indicated siRNA (control = scrambled PLD1 and PLD2 target sequences) were incubated for 10 min in calcium-free Locke's solution or stimulated for 10 min with 59 mM K⁺. The net GH release is obtained by subtracting amounts of basal GH release from GH release after stimulation in each condition. Of note, PLD1 or PLD2 silencing did not significantly modify basal GH release (not shown). **E-G)** Chromaffin cells were treated with the indicated concentration of the PLD inhibitor FIPI, the PLD1 inhibitor CAY10593 (C93) or the PLD2 inhibitor CAY10594 (C94) for 1 hour and stimulated for 10 min with the indicated secretagogues (nicotine 10 μM, 20 μM free Ca²⁺ for streptolysin-O (SLO)-permeabilized cells or K⁺ 59 mM) in the presence of PLD inhibitors. Catecholamine release was estimated using the adrenolutine assay and basal release was subtracted to obtain the net catecholamine secretion. CgA release was estimated by Western blot in resting (R) and stimulated condition (S) before quantification. Data are given as the mean values ± S.D. obtained in three experiments performed on different cell cultures (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

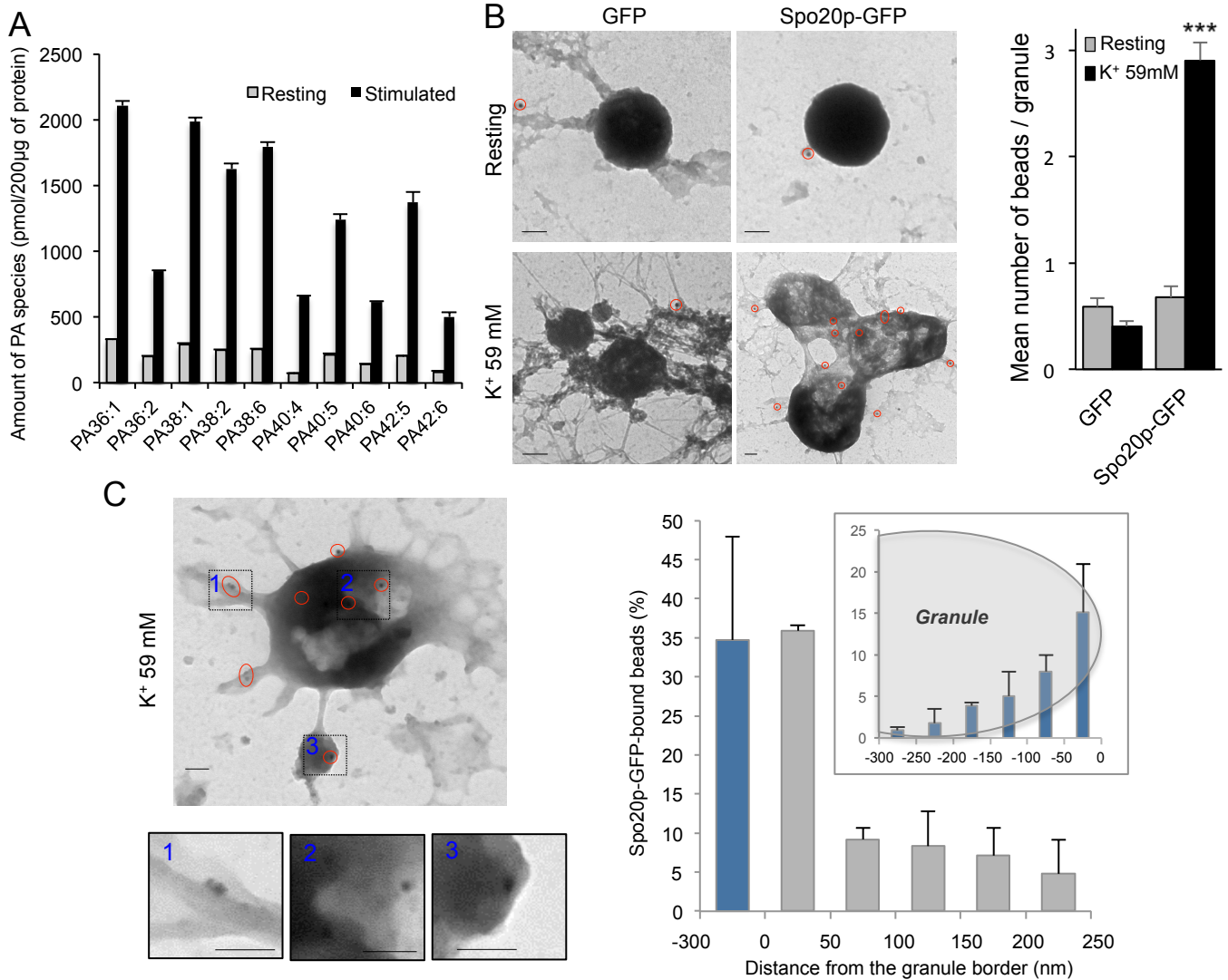


Figure 2: Different PA species are found at granule docking sites during exocytosis. A) Lipidomics identifying the 10 most abundant PA species in the plasma membrane from PC12 cells maintained in resting condition (Resting) or stimulated for 10 min with 59 mM K⁺ (Stimulated). Data are means \pm S.D. (n=4). **B)** Electron micrograph of anti-GFP immunogold-labeled plasma membrane sheets prepared from chromaffin cells expressing Spo20p-GFP or GFP as a control. Cells were stimulated for 10 min with 59 mM K⁺. Bar = 100 nm. Red circles highlight gold particles. **C)** Zooms illustrating the presence of gold particles below secretory granules and close to actin structures. The mean number of gold particles found in the area corresponding to 500 nm from the center of the granule was quantified (error bars indicate \pm S.E.M.; n > 65 images from two independent experiments). *** $p < 0.001$. Inset shows distribution of particles under the granule.

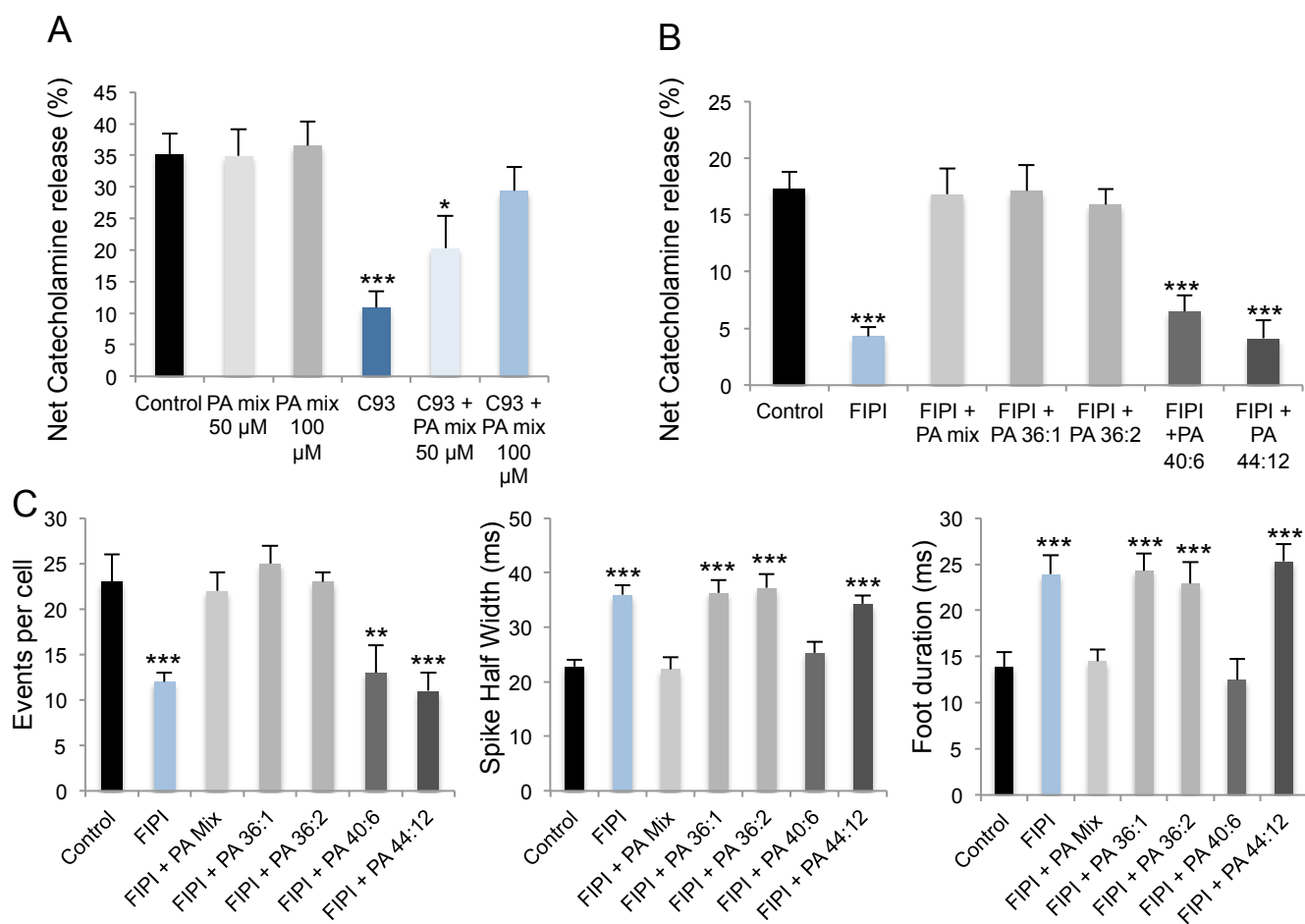


Figure 3: Different PA species rescue distinct stages of exocytosis. A-B) Chromaffin cells were treated with the PLD1 inhibitors CAY10593 50 nM (C93), FIPI 750 nM or vehicle (control) for 1h and incubated with the indicated concentration of a PA mixture or 10 μ M of the indicated PA species for 15 min prior to stimulation with 10 μ M nicotine. Catecholamine release was estimated using the adrenolutine assay and basal release was subtracted to obtain the net catecholamine secretion. Data are given as the mean values \pm S.D. obtained in three experiments performed on different cell cultures ($n=3$). * $p<0.05$, *** $p<0.001$. C) Chromaffin cells were treated with FIPI 750 nM or vehicle (control) for 1h and incubated with the indicated PA for 15 min before stimulation with a local application of Locke's solution containing 100 mM K^+ for 10 s. Catecholamine secretion was monitored by carbon fiber amperometry. Data are expressed as means \pm S.D. ($n > 75$ cells for each condition from three independent cell cultures). In cells treated with FIPI, PA mixture rescues the number of exocytotic events and the individual spike parameters (spike half-width and foot duration). Monounsaturated PA rescues only the number of events but not the spike parameters. At the opposite, polyunsaturated PA rescues spike parameters but not the number of events. *** $p<0.001$.

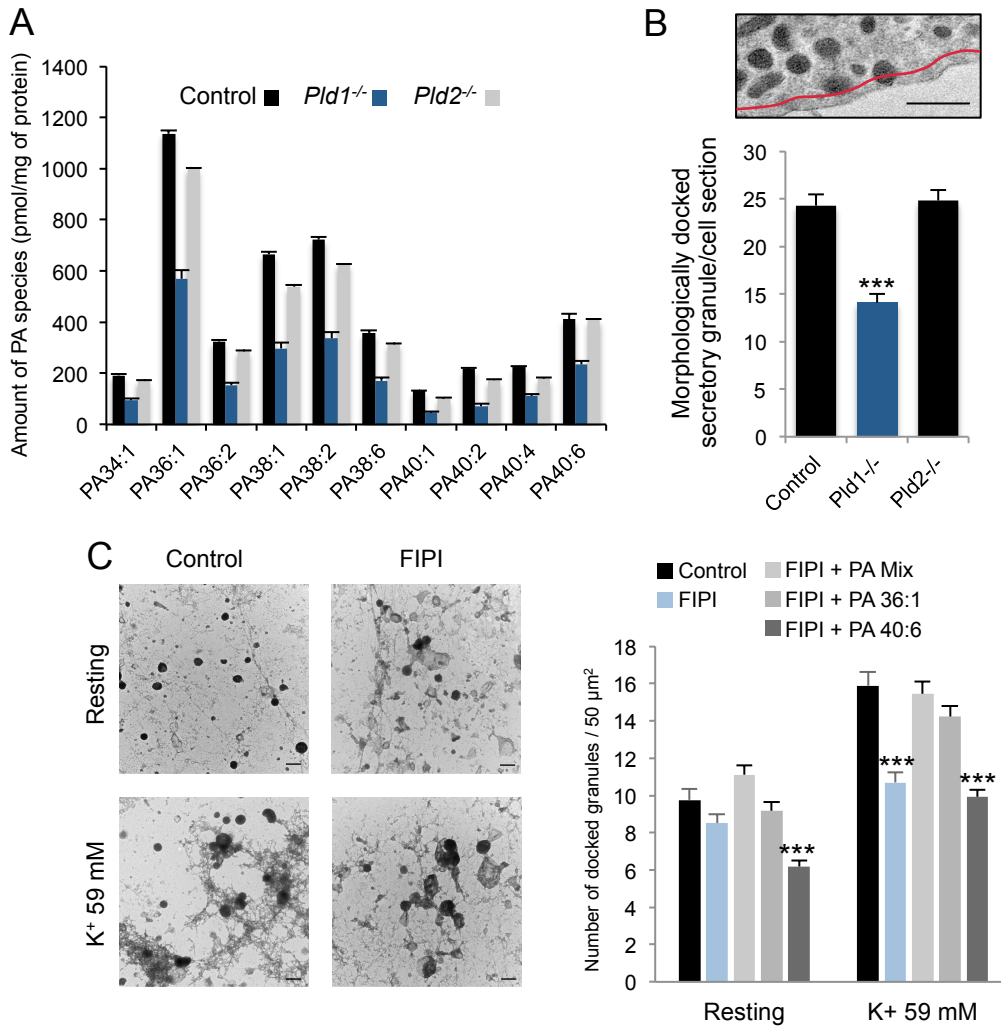
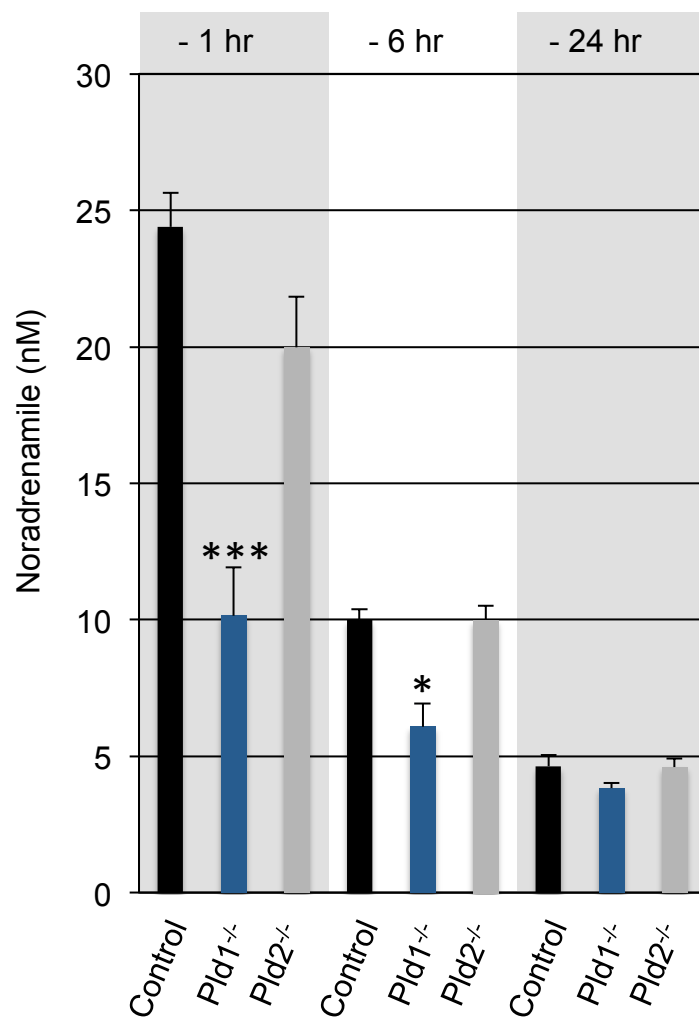
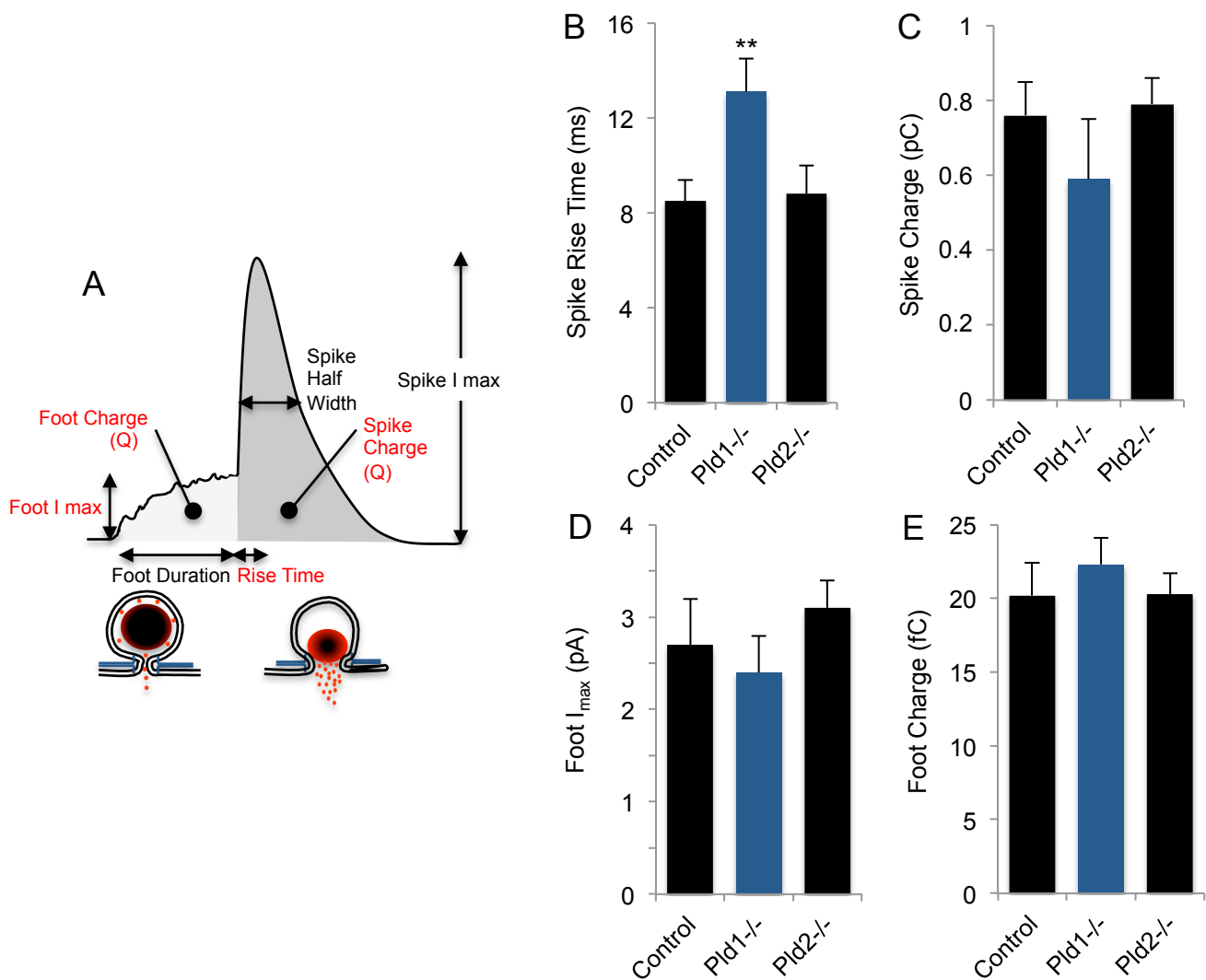


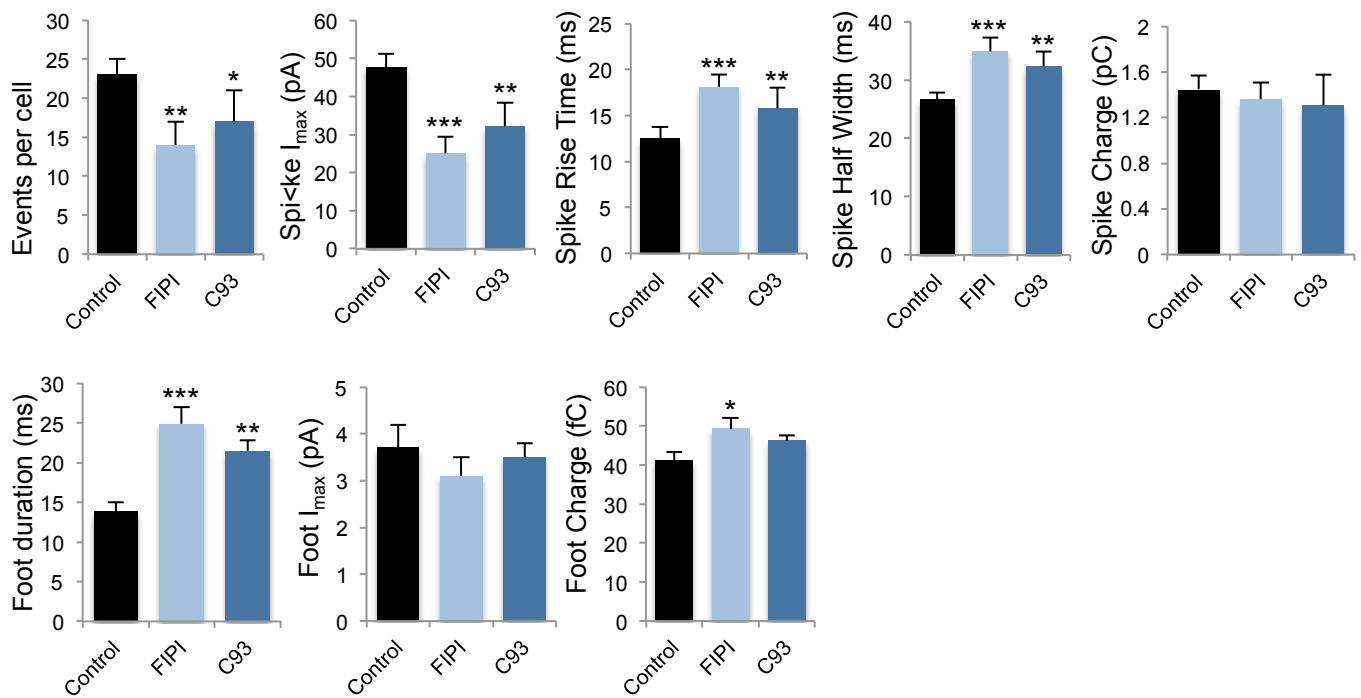
Figure 4: PA modulates secretory granule docking. A) Lipidomic identification of the 10 most abundant PA species in adrenal glands collected from wild-type (WT), *Pld1*^{-/-}, or *Pld2*^{-/-} mice. Data are means \pm S.D. (n=4). **B)** Representative section of a transmission electron micrograph of an adrenal medulla slice from 3 months old wild-type mice. Number of morphologically docked secretory granules per cell section present in the 50 nm below the plasma membrane (red line) were counted in the adrenal medulla of wild type (Control), *Pld1*^{-/-}, *Pld2*^{-/-} mice. n = 6 mice per genotype from which 50 slices were analyzed per mice. *** $p < 0.001$. Bar = 1 μ m **C)** Electron micrograph plasma membrane sheets prepared from resting or K⁺ 59 mM stimulated (5 min) chromaffin cells. Cells were pre-incubated in the presence or not of FIPI 750 nM with or without the application of the indicated PA for 15 min before stimulation. The number of granules morphologically docked on plasma membrane sheets was quantified manually on random fields. Data are presented as means \pm S.E.M. n > 60 images from three different cell cultures for each condition. Bar = 500 nm. *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test)



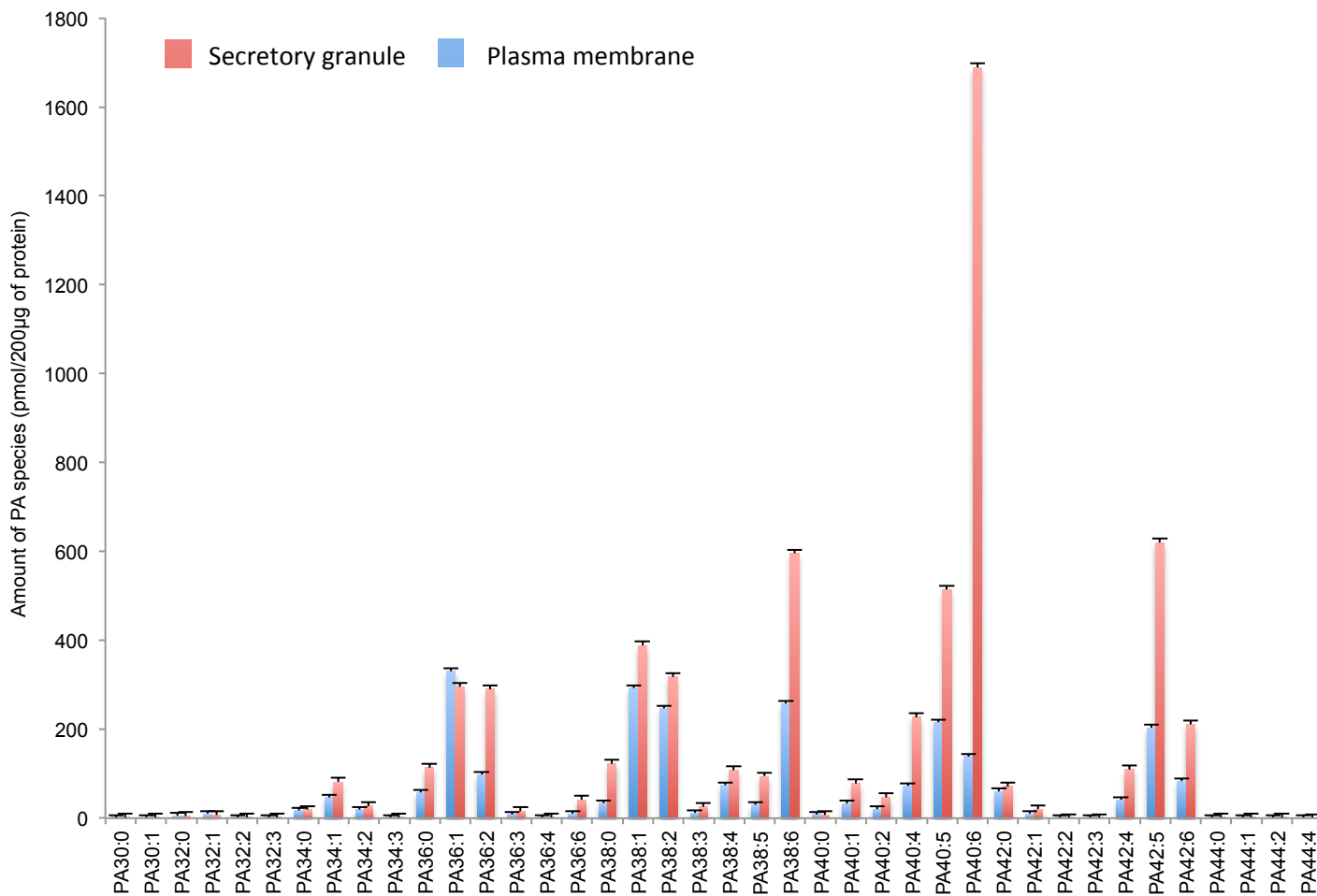
Supplemental Figure1: Noradrenaline levels were measured from blood of new-born wild-type (Control), *Pld1*^{-/-}, or *Pld2*^{-/-} mice 1 hour (-1 hr), 6 hours (-6 hr), or 24 hours (-24 hr) after birth. Data are expressed as means \pm S.D. (n > 9, *p<0.05, *** p<0.001).



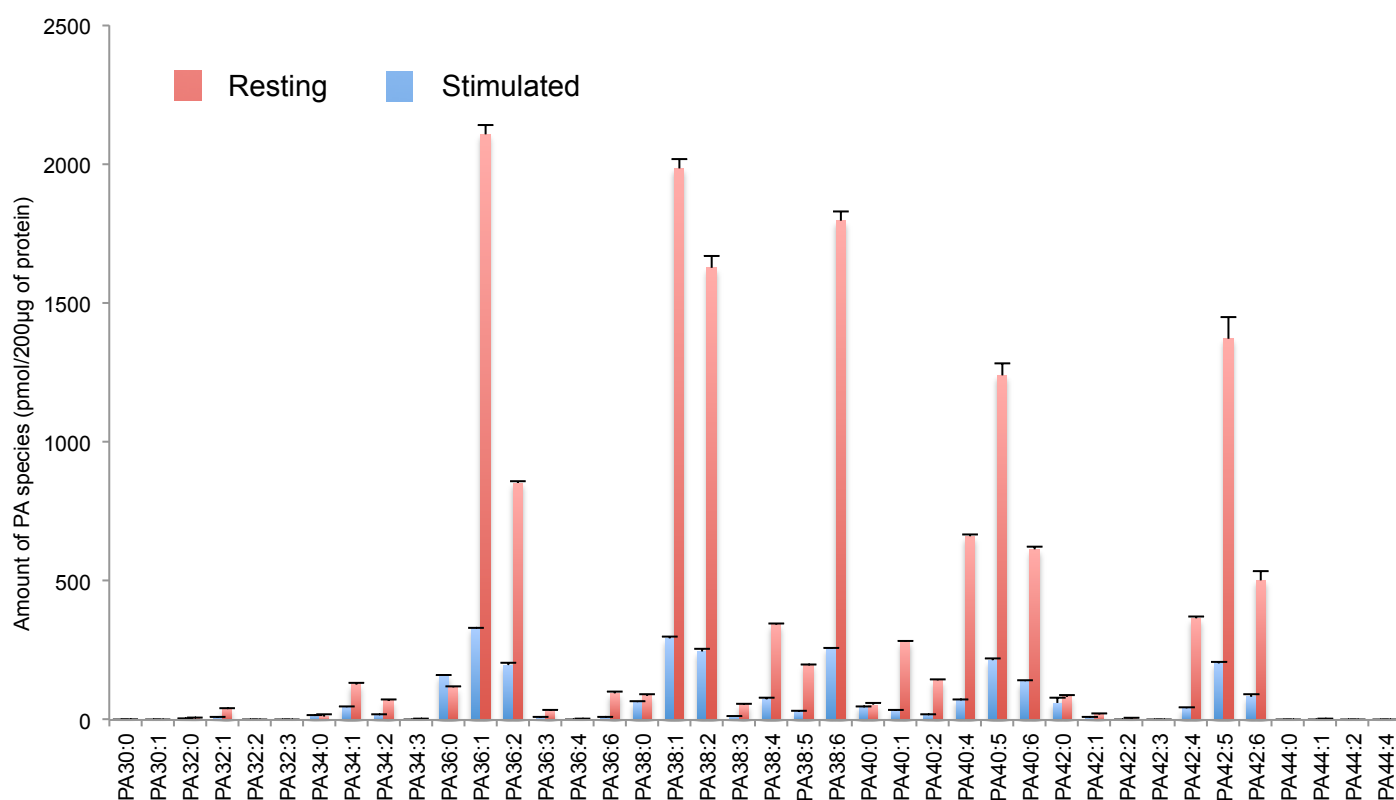
Supplemental Figure 2: Effect of *Pld1* knockout on amperometric spike parameters. **A)** Schema showing the different spike parameters of the amperometric response measured from wild-type (control), *Pld1*^{-/-}, and *Pld2*^{-/-} mice chromaffin cells. In red are four parameters measured including spike rise time (**B**) spike charge (**C**), foot amplitude (**D**), and foot charge (**E**). Data are expressed as mean \pm S.D. ($n > 100$ cells for each condition from four independent cell cultures). ** $p < 0.01$.



Supplemental Figure 3: Effect of PLD inhibition on amperometric spike parameters from bovine chromaffin cells. Bovine chromaffin cells were incubated 1 hr with or without FIPI 750 nM and CAY93 50 nM and stimulated with a local application of 100 μ M of nicotine for 10 s with or without the PLD inhibitors. Catecholamine secretion was monitored using carbon fibre amperometry. The number of events and the indicated spike parameters are expressed as mean \pm S.D. ($n > 80$ cells for each condition from four independent cell cultures). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

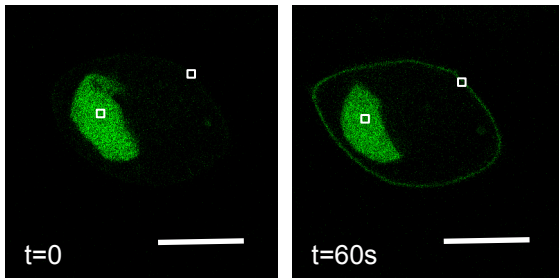


Supplemental Figure 4: Total membranes from 400×10^6 PC12 cells were subjected to ultracentrifugation on sucrose gradient to purify plasma and secretory granule membranes. PA species levels were measured by lipidomics from aliquots containing 200 µg of proteins each. PA amounts are expressed as pmol of PA per 200 µg of proteins. Data are expressed as means \pm S.D. (n=4 independent cell cultures).

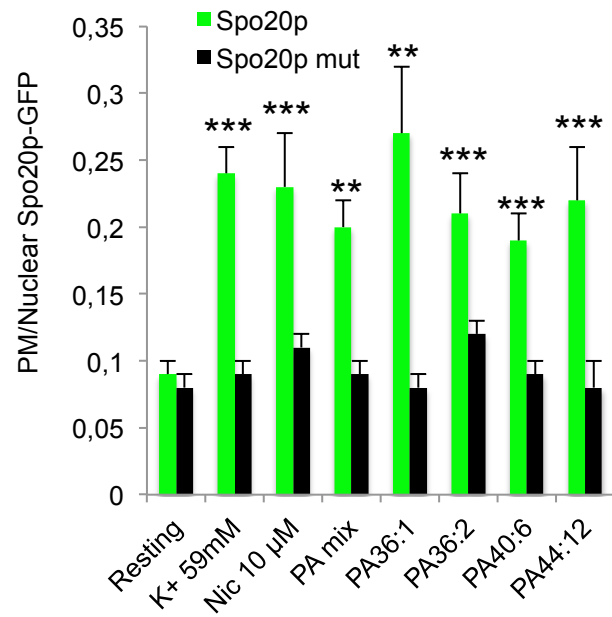


Supplemental Figure 5: Total membranes from 400×10^6 resting or 59 mM K^+ stimulated PC12 cells were subjected to ultracentrifugation on sucrose gradient to purify plasma membranes. PA species levels were measured by lipidomics from aliquots containing 200 μ g of proteins each. PA amounts are expressed as pmol of PA per 200 μ g of proteins. Data are expressed as means \pm S.D. (n=4 independent cell cultures).

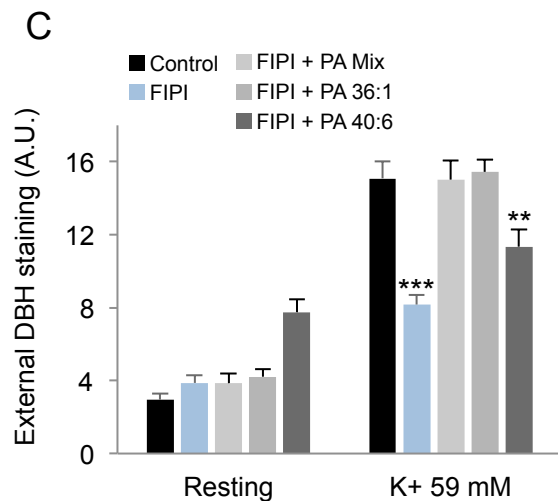
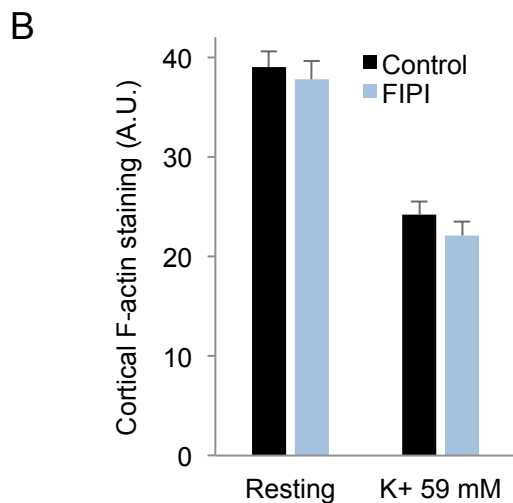
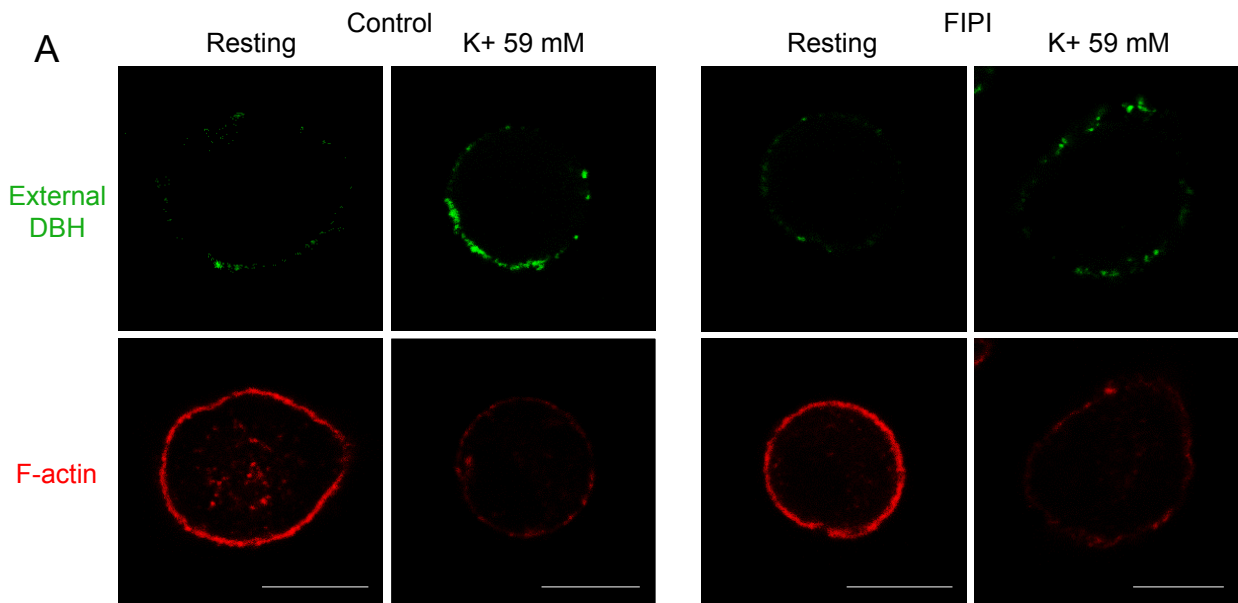
A



B



Supplemental Figure 6: Extracellular PA reaches the inner leaflet of the plasma membrane. **A)** Chromaffin cells expressing Spo20p-GFP were incubated with 100 µM of a PA mix and images were taken at the indicated time. **B)** Quantification of the signal ratio of Spo20p-GFP or Spo20p-GFP mutated at the plasma membrane over the nucleus in resting cells, or after stimulation with K⁺ 59mM or 10 µM nicotine for 10 minutes, or after a 5 min incubation with the indicated PA. Data are presented as means ± S.D. with n > 30 cells for each condition from two independent cell cultures. ** p<0.01, ***p<0.001.



Supplemental Figure 7: Inhibition of PLD reduces the number of exocytosis sites without preventing cortical actin depolymerization. A) Chromaffin cells incubated or not with FIPI 750 nM for 1 hr were maintained at rest or stimulated with K⁺ 59 mM containing or not FIPI and anti-dopamine β -hydroxylase (DBH) for 5 min. Cortical F-actin was stained by phalloidin-TRITC. **B)** Quantification of cortical F-actin staining. Data are presented as means \pm S.E.M. with $n > 30$ cells for each condition from three independent cell cultures). **C)** Chromaffin cells were treated as in B, but also incubated with the indicated PA for 15 min prior to cell stimulation. Quantification of extracellular staining was performed on $n > 30$ cells for each condition and given as the mean values \pm S.E.M. obtained in three experiments performed on different cell cultures ($n=3$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

III. Discussion et résultats complémentaires

À l'aide d'enregistrements ampérométriques et d'observations en microscopie confocale et électronique, nous avons pu découvrir que la synthèse de diverses sous-espèces de PA par la PLD1 est impliquée dans plusieurs étapes de l'exocytose. Nous avons ainsi démontré que la formation de PA monoinsaturés au niveau des sites d'exocytose pouvait contribuer à l'arrimage des granules après stimulation, alors que les formes polyinsaturées et contenant notamment des acides gras oméga-3 participent à la fusion membranaire en régulant la dynamique du pore de fusion.

J'exposerai également dans cette partie quelques résultats complémentaires qui seront discutés de la même façon. Les protocoles expérimentaux relatifs aux expériences ne figurant pas dans l'article seront décrits à la suite de la discussion, dans la partie Matériel et Méthodes.

A. *L'activité de la PLD1 régule plusieurs étapes au cours de l'exocytose*

Dans les cellules chromaffines, la PLD1, et non la PLD2, apparaît être l'isoforme contrôlant la libération des catécholamines sous l'effet d'une stimulation par un sécrétagogue (Vitale *et al.*, 2001). Obtenues initialement par des expériences de surexpression, ces données ont pu être confirmées ici grâce à l'utilisation d'ARN interférents ainsi que d'inhibiteurs spécifiques des PLD. Nous avons pu attester l'importance physiologique de l'activité de la PLD1 dans la libération de médiateurs du stress en utilisant des modèles transgéniques développés auparavant (Elvers *et al.*, 2010). Curieusement, le modèle murin invalidé pour la PLD1 (*Pld1*^{-/-}) ne présente pas d'anomalies majeures au niveau phénotypique. Cependant, un défaut d'exocytose menant à un retard de la croissance neuritique avait déjà pu être mis en évidence dans ce modèle (Ammar *et al.*, 2013), ce qui pourrait expliquer le retard temporaire de développement cérébral observé par IRM sur ces souris (Burkhardt *et al.*, 2014b). Des expériences d'ampérométrie réalisées sur des cellules chromaffines murines nous ont permis de disséquer les rôles de la PLD1 dans la sécrétion au niveau cellulaire. L'altération importante de l'exocytose observée dans les cellules *Pld1*^{-/-} est due à une diminution du nombre d'événements ainsi qu'à un délai dans la fusion des granules. De façon importante, l'ensemble de ces effets a été reproduit à l'identique par un traitement avec le FIPI, un inhibiteur agissant à la fois sur PLD1 et PLD2. Des travaux précédents de l'équipe ont révélé que la PLD1 est l'isoforme principalement exprimée dans les cellules chromaffines et qu'elle présente une forte expression à la membrane plasmique (Vitale *et al.*, 2001 ; Zeniou-Meyer *et al.*, 2008). Ceci expliquerait que l'utilisation du FIPI ou d'un inhibiteur spécifique de la PLD1 (CAY 10593) affectent les paramètres de l'exocytose de la même façon que l'extinction du gène *Pld1*. La suite de ce travail ayant nécessité l'utilisation d'un nombre important de cellules ainsi qu'un contrôle spatiotemporel de l'inhibition des PLD, nous avons ainsi utilisé des cellules chromaffines bovines et des cellules PC12, que nous avons traitées avec le FIPI.

B. Différentes espèces de PA sont impliquées dans l'arrimage et la fusion

Les expériences d'ampérométrie ont montré un ralentissement de la cinétique de fusion du granule avec la membrane plasmique lorsque la PLD1 est non fonctionnelle. L'implication de la PLD1 dans les étapes tardives de fusion avait été proposée par des expériences antérieures. Ces dernières montraient que l'ajout de LPC, un lipide de forme conique s'insérant dans le feuillet externe de la membrane plasmique, pouvait restaurer l'activité sécrétrice des cellules chromaffines (Amatore *et al.*, 2006 ; Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Le modèle admis pour expliquer cet effet est que la courbure négative de la membrane plasmique induite par le PA favoriserait la mise en place des étapes d'hémifusion (Chernomordik *et al.*, 1995). Nos résultats démontrent une restauration spécifique de la cinétique de fusion grâce à des PA polyinsaturés, ce qui est en faveur de ce modèle. En effet, contrairement aux PA monoinsaturés, ces lipides comportent des chaînes hautement flexibles qui désorganisent la membrane et peuvent alors entraîner de très fortes courbures négatives. Les analyses de lipidomique ont par ailleurs indiqué que le PA 40:6 était la forme très largement prédominante au niveau des granules de sécrétion. Il est également intéressant de constater que l'ajout du PA 40:6 sur des cellules au repos entraîne une réduction du nombre de granules arrimés visibles sur les feuilletts de membrane plasmique, en parallèle d'une augmentation des sites de fusion observables grâce au marquage de la dopamine β -hydroxylase (DBH) en périphérie. Ceci suggère que l'ajout de ce type de PA puisse favoriser une fusion spontanée des granules, ce qui coïncide avec un rôle du PA sur la topologie membranaire, indépendamment de la machinerie protéique de l'exocytose.

Grâce à l'induction d'une courbure négative, le PA pourrait également modifier la conformation des protéines du complexe SNARE et entraîner leur association. Par ailleurs, des expériences réalisées en collaboration avec notre équipe ont révélé que le PA pouvait, grâce à des interactions électrostatiques, interagir directement avec la syntaxine 1A, et que la neutralisation de cette liaison par mutagenèse dirigée affecte la cinétique des étapes tardives de l'exocytose (Lam *et al.*, 2008). Nous pouvons alors proposer que la réduction des niveaux de PA à la membrane plasmique réduirait l'ancrage membranaire de la syntaxine 1A au niveau des sites d'exocytose, ce qui pourrait altérer la formation du complexe SNARE et/ou les étapes de sa réorganisation au cours de la fusion, mais ceci devra être testé expérimentalement dans nos conditions. Des essais *in vitro* ont également révélé que le PA présent dans des liposomes contenant les protéines du complexe SNARE favorise la fusion des membranes (Vicogne *et al.*, 2006 ; Mima et Wickner, 2009). De façon intéressante, le PA présent dans ces liposomes est monoinsaturé, indiquant que cette forme puisse dans certaines conditions induire des déformations membranaires conséquentes. Étonnamment, l'ajout de PA polyinsaturés n'est pas suffisant pour restaurer le nombre d'événements de sécrétion régulée lorsque l'activité de la PLD est inhibée, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes d'action du PA en parallèle.

Nous avons ainsi pu observer également qu'en l'absence de PLD1 fonctionnelle, le nombre d'événements d'exocytose était fortement réduit, en lien avec une diminution du nombre de vésicules arrimées à la membrane plasmique dans les cellules stimulées préincubées avec le FIPI. Ceci est cohérent avec les observations réalisées sur des coupes de cellules chromaffines de souris *Pld1*^{-/-}, sur lesquelles nous avons pu quantifier une réduction de moitié du nombre de granules morphologiquement arrimés par rapport aux cellules contrôles. Les immunomarquages de la DBH extracellulaire ont permis de clarifier que la diminution des sites d'exocytose était bien en lien avec une diminution du nombre de sites de fusion. Ces données suggèrent que le PA produit par la PLD1 ait un rôle à jouer dans le recrutement ou l'arrimage des granules durant l'exocytose. Cependant, l'implication de la PLD dans les étapes précoces de l'exocytose a été extrêmement peu étudiée à ce jour. Un travail récent utilisant pour modèle des œufs d'oursins a par exemple montré que le PA généré par la PLD affectait les étapes d'arrimage et d'amorçage avant la fusion (Rogasevskaia et Coorsen, 2015). De façon intéressante, l'ajout de PA monoinsaturé restaure les capacités de sécrétion des cellules traitées avec le FIPI, mais également le nombre d'événements détectés et le nombre de sites d'exocytose, indiquant que ce paramètre est le facteur majoritaire régulant le niveau de sécrétion. Les analyses de lipidomique à partir d'extraits de glandes surrénales des souris transgéniques montrent notamment une diminution significative dans le niveau des espèces de PA monoinsaturées (36:1 et 38:1) dans les échantillons *Pld1*^{-/-} par rapport aux extraits issus de souris sauvages, ce qui suggère l'implication essentielle de ces formes dans la sécrétion neuroendocrine.

C. Des formes mono- et polyinsaturées de PA sont produites au niveau de la membrane plasmique durant l'exocytose

Avant d'affirmer que les effets des différents PA se produisent au niveau des sites d'exocytose, il était tout d'abord nécessaire de vérifier que les PA exogènes sont capables de s'insérer dans la membrane pour transloquer vers le feuillet interne. L'utilisation de la sonde Spo20p nous a permis de valider ce concept, et a montré en parallèle que cette sonde reconnaissait les formes monoinsaturées mais également les polyinsaturées dans une moindre mesure. Ces résultats sont en accord avec notre étude précédente, qui a estimé l'affinité de sondes du PA, dont Spo20p, pour différents types de PA contenus dans des liposomes (Kassas *et al.*, 2017). De façon intéressante, la cinétique du recrutement de ces PA exogènes par cette sonde est proche de celle observée en TIRF lors de la production de PA suite à une stimulation de l'exocytose (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Ceci suggère que nos conditions expérimentales permettent d'atteindre des niveaux de PA dans le feuillet interne de la membrane plasmique à des niveaux au moins similaires à ceux obtenus lors de l'exocytose. Il faut toutefois garder en tête que les données obtenues reposent sur l'apport de PA exogènes, il est donc essentiel d'évaluer la formation de ces PA de façon endogène. Nos analyses de lipidomique ont ainsi révélé une forte augmentation des niveaux de sous-espèces de PA mono- et polyinsaturées à la membrane plasmique après stimulation de l'exocytose. Ces

résultats nous ont amené à penser que ces différents types de PA pourraient être formés au site d'exocytose afin d'exercer leur action séquentiellement sur différentes étapes de la sécrétion.

Grâce à l'utilisation de la sonde Spo20p, les travaux de notre équipe ont fait le lien entre l'activation de la PLD1 suite à une stimulation par un sécrétagogue et la production de PA à la membrane plasmique dans les cellules chromaffines. Une analyse morphométrique réalisée par microscopie électronique sur des coupes de cellules a notamment révélé une accumulation de Spo20p au niveau de zones où les granules de sécrétion sont morphologiquement arrimés (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Nous avons alors précisé cette localisation grâce à des feuillettes de membrane plasmique de cellules exprimant Spo20p, observés en microscopie électronique. Ces observations ont confirmé la formation de PA au niveau du site d'exocytose suite à la stimulation des cellules, visualisable grâce au recrutement de la sonde Spo20p au niveau de ces sites. Il est très intéressant de constater que le marquage de Spo20p se subdivise globalement en deux « pools », l'un sous le granule et l'autre dans les 50 nm à partir du bord du granule, associé à des structures de cytosquelette d'actine en faisceaux (ou câbles), décrites comme permettant l'ancrage des granules à la membrane plasmique (Gabel *et al.*, 2015). Selon les résultats des expériences de restauration, nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le PA situé sous le granule soit plutôt de type polyinsaturé et participe à l'ouverture du pore de fusion, alors que celui présent au niveau des câbles d'actine serait monoinsaturé et contribuerait à l'ancrage des granules aux sites d'exocytose. La sonde Spo20p séquestrant le PA dès sa reconnaissance, nous pouvons envisager que ces résultats ne soient pas biaisés par une diffusion du PA dans la bicouche. En comparaison avec des travaux précédents de notre équipe, la localisation de Spo20p à proximité des granules semble coïncider avec celle d'autres acteurs de l'exocytose, tels que la syntaxine, le PI(4,5)P₂ et l'annexine A2 (Umbrecht-Jenck *et al.*, 2010). Par la suite nous pourrions alors envisager des études de comarquages du PA avec ces acteurs sur les feuillettes de membrane, afin d'estimer leur lien dans le processus d'exocytose.

D. Quel mécanisme d'action du PA dans l'ancrage des granules au site d'exocytose ?

La question des mécanismes d'action des différents PA lors de l'exocytose régulée, notamment des formes monoinsaturées, reste non résolue. Je présenterai ici des résultats complémentaires non publiés qui amènent des pistes de travail pour la suite.

À la suite de cette étude, nous avons cherché à identifier le mode d'action du PA sur l'ancrage des granules aux sites d'exocytose. Nous nous sommes basés dans un premier temps sur une observation effectuée sur les feuillettes de membrane incubés avec le FIPI. Sur ces feuillettes et après stimulation, les granules présentent en général beaucoup moins de structures d'ancrage à la membrane plasmique que sur les feuillettes contrôles (**figure 35**). Cela indiquerait donc que l'inhibition de la PLD bloque la formation de ces câbles d'actine. J'ai alors effectué sur ces feuillettes un marquage de l'actine, qui a conforté cette hypothèse puisque ce marquage disparaît

drastiquement sur les feuillettes de cellules stimulées et préincubées avec l'inhibiteur de PLD. Nous pouvons donc imaginer que l'effet du PA sur le nombre de granules arrimés serait en lien avec la génération de ces filaments d'ancrage. En faveur de cette hypothèse, des microdomaines de PA formés par la PLD ont été impliqués récemment dans la formation de faisceaux d'actine au niveau des podosomes (Bolomini-Vittori *et al.*, 2019). Il serait intéressant maintenant de visualiser l'aspect des sites d'exocytose suite à des expériences de restauration avec les PA mono- et polyinsaturés, afin de vérifier si la forme monoinsaturée est impliquée dans la formation de ces câbles d'actine.

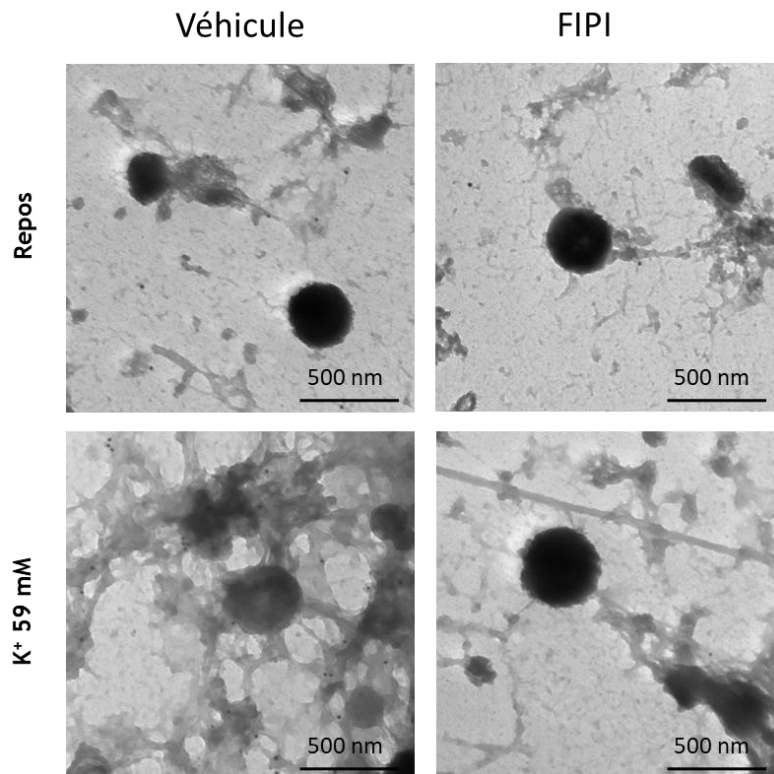


Figure 35 : La PLD semble participer à la mise en place de câbles d'actine au niveau des sites d'exocytose

Les cellules ont été stimulées ou non avec une solution dépolarisante de K^+ 59 mM, puis des feuillettes de membrane plasmique ont été préparés. Un anticorps anti-actine a été utilisé afin de marquer les structures d'actine au niveau des sites d'exocytose et le marquage a été révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à des billes d'or de 15 nm de diamètre. Les feuillettes sont observés ensuite au microscope électronique à transmission, à un grossissement de x80 000.

Par ailleurs, une faible proportion de ces faisceaux a également pu être notée sur les feuillettes obtenus à partir de cellules stimulées exprimant Spo20p. Il est connu que cette sonde interfère dans le processus d'exocytose, probablement *via* la séquestration du PA (Kassas *et al.*, 2012). Cela nous indique que l'effet du PA sur la mise en place des câbles d'actine est probablement médié par une interaction avec une ou plusieurs protéines cibles, qui serait inhibée de façon compétitive par la liaison de Spo20p. Un effet similaire a été observé par exemple pour

la protéine Tat, dont la forte affinité pour le PI(4,5)P₂ interfère avec l'exocytose en empêchant l'interaction de ce phosphoinositide avec ses effecteurs protéiques (Tryoen-Tóth *et al.*, 2013 ; Beaumelle *et al.*, 2017). Parmi les candidats pouvant intervenir dans la formation de câbles d'actine, l'annexine A2 représente une cible du PA potentielle. En effet, il a été démontré que cette protéine est recrutée à la membrane plasmique suite à la stimulation de l'exocytose et qu'elle possède un rôle clé dans la formation des faisceaux d'actine reliant les granules et la membrane plasmique. En présence de calcium, l'annexine A2 est capable de lier des filaments d'actine pour entraîner leur fasciculation, tout en interagissant avec des lipides anioniques présents au niveau du site d'exocytose (Grill *et al.*, 2018). Des données de l'équipe ont montré que l'annexine A2 avait notamment une affinité significative pour le PA (Gabel *et al.*, 2019). De plus, des expériences d'ampérométrie avec des cellules exprimant des mutants d'annexine A2 ont montré une réduction du nombre d'événements ainsi qu'un ralentissement de la fusion, de façon très similaire à ce qui a été observé dans les cellules *Pld1*^{-/-} ou après traitement au FIPI (Gabel *et al.*, 2015). Ainsi, la formation de PA à proximité des granules arrivant au contact des sites d'exocytose pourrait favoriser le recrutement de l'annexine A2 et par conséquent l'arrimage des granules. Nous pourrions examiner cette hypothèse en estimant si le recrutement de l'annexine A2 durant l'exocytose est affecté par l'inhibition de la PLD, en effectuant tout d'abord des immunomarquages.

Les résultats discutés précédemment montrent que suite à la stimulation de l'exocytose, le nombre de granules recrutés au niveau de la membrane plasmique diminue lorsque la PLD1 est inhibée. Ceci pourrait également indiquer un défaut de recrutement des granules aux sites d'exocytose. Nous avons pu mettre en évidence que l'inhibition de la PLD peut interférer avec la mise en place de câbles d'actine au niveau de ces sites. Or le remodelage de l'actine durant l'exocytose est également important pour le transport des granules à la membrane plasmique (Trifaró *et al.*, 2008). Il est donc possible qu'un défaut de PA formé par la PLD puisse ralentir leur arrivée. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai observé l'effet de l'inhibition des PLD sur la mobilité des granules de sécrétion. Pour cela, j'ai enregistré à l'aide d'un microscope confocal à *spinning disk* le mouvement des granules en trois dimensions dans des cellules PC12 préincubées ou non avec le FIPI. Ces cellules ont été transfectées préalablement afin d'exprimer un marqueur granulaire couplé à une protéine rouge fluorescente (NPY-RFP). Des analyses de suivi de trajectoires ont permis de mettre en évidence un ralentissement du mouvement des granules dans les cellules où l'activité de la PLD est inhibée (**figures 36A et 36B**).

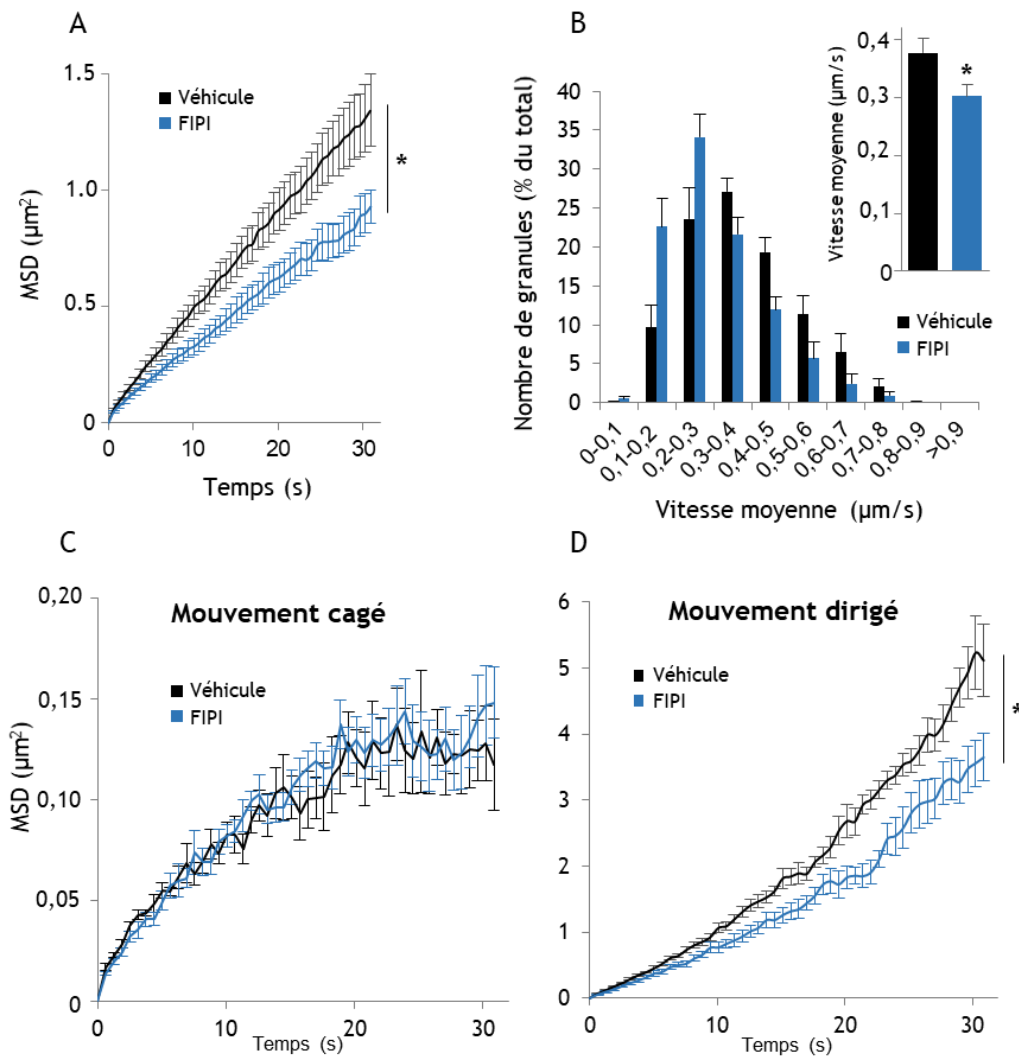


Figure 36 : L'activité PLD influence la mobilité des granules de sécrétion dans les cellules PC12

Les cellules PC12 exprimant NPY-RFP sont incubées 1 heure à 37°C avec le FIPI à 750 nM ou le DMSO à 0,01% (véhicule). Des *stacks* sont effectués au microscope confocal à *spinning disk* toutes les 630 ms. Puis les vidéos sont analysées afin de suivre la trajectoire des granules marqués (150-200 tracks/cellule). Les différents paramètres de mouvement sont ensuite extraits et analysés (n=9 cellules pour chaque condition, 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm SEM.

- A)** Déplacement quadratique moyen (*mean square displacement*, MSD) de l'ensemble des granules analysés en fonction du temps (* p<0,05, ANOVA à un facteur contrôlé).
- B)** Vitesses moyennes de l'ensemble des granules analysés et profil des vitesses selon des intervalles de 0,1 μm (* p<0,05, test de Student).
- C)** MSD en fonction du temps de la population de granules présentant un mouvement de type cagé.
- D)** MSD en fonction du temps de la population de granules ayant un mouvement de type dirigé (* p<0,05, ANOVA à un facteur contrôlé).

Or dans des conditions de repos comme après stimulation, différentes populations de granules ont été identifiées dans les cellules chromaffines et PC12, selon leur type de mouvement : libre, dirigé ou cagé (Li *et al.*, 2004 ; Maucort *et al.*, 2014). Ces trois types de mouvement correspondent globalement aux étapes de la sécrétion. Ainsi les granules « libres » sont plutôt

situés à proximité de l'appareil de Golgi après leur formation, les granules « dirigés » sont ceux qui sont transportés vers la périphérie, et les granules « cagés » sont les granules arrimés à la membrane plasmique. Des analyses effectuées après filtrage des types de mouvement ont montré un ralentissement spécifique des granules ayant un mouvement dirigé lorsque la PLD est inhibée, alors qu'aucune différence à ce niveau n'est observée pour les granules ayant un mouvement cagé (**figures 36C et 36D**). Ces résultats indiquent que l'inhibition de la PLD pourrait affecter le transport des granules jusqu'aux sites d'exocytose, en lien avec un défaut de néopolymérisation d'actine par exemple. Un rôle important du PA dans la réorganisation du cytosquelette d'actine *via* le recrutement de protéines de régulation de la dynamique de l'actine a déjà été observé dans différents modèles (Kam et Exton, 2001 ; Bohdanowicz *et al.*, 2013 ; Pleskot *et al.*, 2014). Il est également concevable qu'un défaut de formation de PA ait des effets non négligeables sur la production du PI(4,5)P₂, et que l'effet sur la polymérisation de l'actine soit en partie médié par cette voie indirecte. Une troisième hypothèse, non exclusive, pourrait correspondre à une action du PA sur les protéines motrices du cytosquelette. En effet, une étude récente vient de mettre en lumière un rôle positif du PA dans le transport vésiculaire *via* l'activation de la kinésine KIF5B (Wang *et al.*, 2017).

Il est important de rappeler que ces données ont été obtenues pour l'instant à partir de cellules PC12, dans lesquelles l'expression de la PLD2 est plus élevée que dans les cellules chromaffines en culture primaire (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Le FIPI étant un inhibiteur non sélectif, il est donc possible que l'inhibition de la PLD2 soit responsable de cet effet. Ces analyses étaient prévues initialement sur les cellules chromaffines, mais celles-ci comportant 100 fois plus de granules que les PC12, les analyses de trajectoires se sont révélées délicates. De plus, notre protocole de stimulation en bain n'a pas permis pour l'instant l'analyse des mouvements en condition stimulée. Ainsi, les mouvements des granules sont ralentis alors que les cellules sont au repos, ce qui est faveur d'un rôle de la PLD2, constitutivement active, alors que la PLD1 est activée lors de la stimulation avec un sécrétagogue. L'implication de la PLD1 pourra être vérifiée en utilisant un inhibiteur sélectif de cette isoforme. Il sera également essentiel de confirmer cet effet dans les cellules chromaffines en culture primaire, ainsi que d'effectuer des acquisitions après stimulation des cellules afin d'estimer si ce ralentissement est en lien avec la réduction du nombre de granules recrutés après stimulation des cellules traitées avec le FIPI. Pour cela, l'une des possibilités est d'utiliser le système RUSH (*retention using selective hooks*), développé par le groupe de Franck Perez (Boncompain *et al.*, 2012). Ce système permet de visualiser uniquement le trajet des granules néoformés grâce à un système de rétention du marqueur granulaire fluorescent dans le RE, qui pourra être libéré suite à l'ajout de biotine. A ce jour, il a été employé majoritairement dans des lignées de cellules non polarisées, ainsi que par le groupe de Juan Bonifacino dans les neurones en culture primaire (Farías *et al.*, 2016). Nous avons ainsi utilisé une construction NPY-GFP couplée à ce système et mis au point le protocole expérimental. Les

premiers tests que j'ai effectués pour l'instant dans les PC12 sont prometteurs. Une autre possibilité pour étudier la mobilité des granules à proximité de la membrane plasmique est évidemment la microscopie TIRF. Des observations avec des cellules préincubées avec le FIPI sont envisagées par la suite.

E. Un rôle de la PLD dans l'endocytose compensatrice ?

L'activité de la PLD a également été impliquée dans l'endocytose, notamment l'internalisation de récepteurs suite à leur activation (Shen *et al.*, 2001). Suite à l'exocytose régulée se produit un phénomène d'endocytose compensatrice, dépendante en grande partie de la clathrine (Ceridono *et al.*, 2011), qui permet notamment de recycler les composants granulaires après la fusion avec la membrane plasmique. Ce processus fait intervenir un remodelage lipidique important pour générer une déformation membranaire (Ory *et al.*, 2013). Nous nous sommes alors posé la question de savoir si la PLD pouvait jouer un rôle dans ce processus. Afin de pouvoir y répondre, j'ai utilisé un test d'internalisation de la DBH développé au laboratoire. La DBH est une enzyme présente sur la face interne des granules de sécrétion, qui devient ainsi accessible à des anticorps présents dans le milieu extracellulaire, uniquement lorsque le granule fusionne avec la membrane plasmique, au niveau du site d'exocytose. La DBH est recapturée avec d'autres composants granulaires quelques minutes après l'exocytose, lors de l'endocytose compensatrice. Ainsi, nous pouvons suivre son internalisation à l'aide d'anticorps placés dans le milieu des cellules après stimulation (Ceridono *et al.*, 2011). La localisation de la DBH peut être ensuite visualisée après immunocytochimie et analysée grâce à une approche de carte de distance euclidienne.

Ayant montré précédemment que l'inhibition de la PLD perturbait l'exocytose dans les cellules chromaffines, il nous a fallu adapter un protocole particulier pour tester spécifiquement l'implication de la PLD1 dans l'endocytose compensatrice. L'utilisation d'inhibiteurs prend alors ici tout son sens comparé à une stratégie d'ARN interférence ou l'utilisation de modèles KO, puisque ces deux dernières approches permettent très difficilement d'envisager de cibler la PLD1 dans l'endocytose sans avoir un effet sur l'exocytose. En effet, le protocole de ce test permet que les cellules soient placées en présence de l'inhibiteur après la stimulation de l'exocytose, pour ne pas interférer dans le processus d'exocytose au préalable. Ainsi, nous avons pu observer un ralentissement de l'endocytose compensatrice lorsque l'activité de la PLD est inhibée (figure 37). En effet, le pourcentage de vésicules internalisées après 5 minutes d'endocytose est réduit d'environ 15% relativement au contrôle, alors que cette différence n'est plus observée après 30 minutes d'endocytose. Cela indique une contribution de la formation du PA dans ce processus, bien que relativement mineure. De façon intéressante, un retard de l'endocytose sans inhibition complète a également été observé en appliquant un inhibiteur spécifique de PLD2 à des cellules épithéliales respiratoires mises en présence d'une souche de virus grippal (Oguin *et al.*, 2014).

L'effet observé suite à l'incubation avec le FIPI est très reproductible, bien que plus modeste que celui observé dans le cadre de l'exocytose. Cela pourrait être dû à une efficacité inférieure du FIPI à 4°C plutôt qu'à 37°C, ou bien dénote d'une implication moindre de la PLD. Des marquages de la clathrine et de la cavéoline pourraient nous indiquer si la PLD participe spécifiquement à l'un de ces deux modes d'endocytose. Par ailleurs, une étude récente a montré que l'addition de lysophospholipides pouvait perturber l'endocytose en induisant une courbure membranaire positive (Ailte *et al.*, 2017). Il serait alors intéressant d'effectuer des tests de restauration avec des PA mono- et polyinsaturés afin d'évaluer une spécificité d'action de l'une ou l'autre des formes de PA dans ce processus.

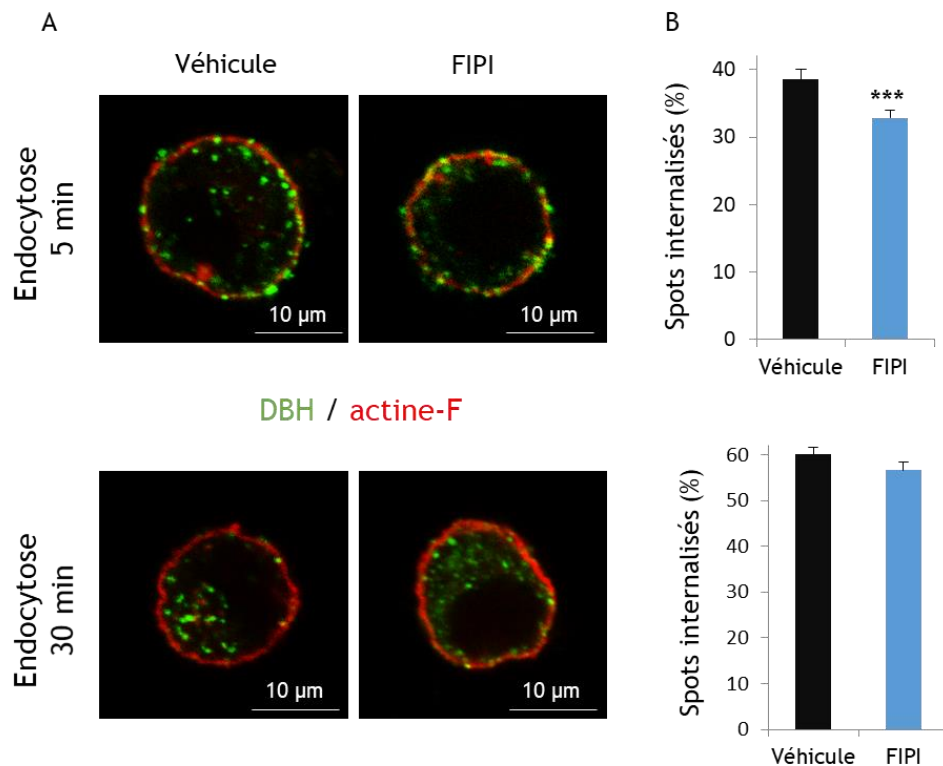


Figure 37 : L'inhibition de la PLD affecte l'endocytose compensatrice

A) Images représentatives après 5 et 30 minutes d'internalisation de la DBH

Les cellules sont stimulées avec 10 μ M de nicotine durant 10 minutes. Après un rinçage rapide, elles sont ensuite incubées 1 heure à 4°C en présence d'anticorps anti-DBH, ainsi que du FIPI à 750 nM ou du DMSO à 0,01% (véhicule). Les cellules sont ensuite à nouveau placées à 37°C 5 ou 30 minutes afin de déclencher l'internalisation de la DBH. Après fixation et perméabilisation, les anti-DBH sont détectés avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa-488. L'actine-F est visualisée après incubation des cellules avec la phalloïdine-TRITC. Les cellules sont observées au microscope confocal en utilisant les mêmes réglages pour les deux conditions.

B) L'inhibition des PLD entraîne un ralentissement de l'endocytose compensatrice

Les acquisitions ont été analysées à l'aide de la méthode de carte de distance euclidienne (*Euclidean distance map*, EDM). Les histogrammes représentent le pourcentage de vésicules internalisées à 5 ou à 30 minutes d'endocytose. Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm SEM (n \geq 50 cellules par condition, 4 expériences indépendantes). *** p<0,001 (test de Mann-Whitney).

IV. Conclusion et perspectives

Nos résultats ont mis en évidence que la synthèse de PA par la PLD1 à proximité des sites d'exocytose joue un rôle essentiel dans les étapes de transport, d'arrimage, de fusion au cours de l'exocytose et même de recapture par endocytose compensatrice (**figure 38**). Bien que ces étapes ne soient pas complètement inhibées par l'altération de la PLD1, l'activité modulatrice de cette enzyme a une importance physiologique fondamentale, étant donné qu'une libération de messagers en faible quantité et pas assez rapidement peut ne pas être suffisante pour entraîner une réaction adaptée de l'organisme. Le rôle de la production du PA dans la dynamique du cytosquelette d'actine reste notamment encore à préciser.

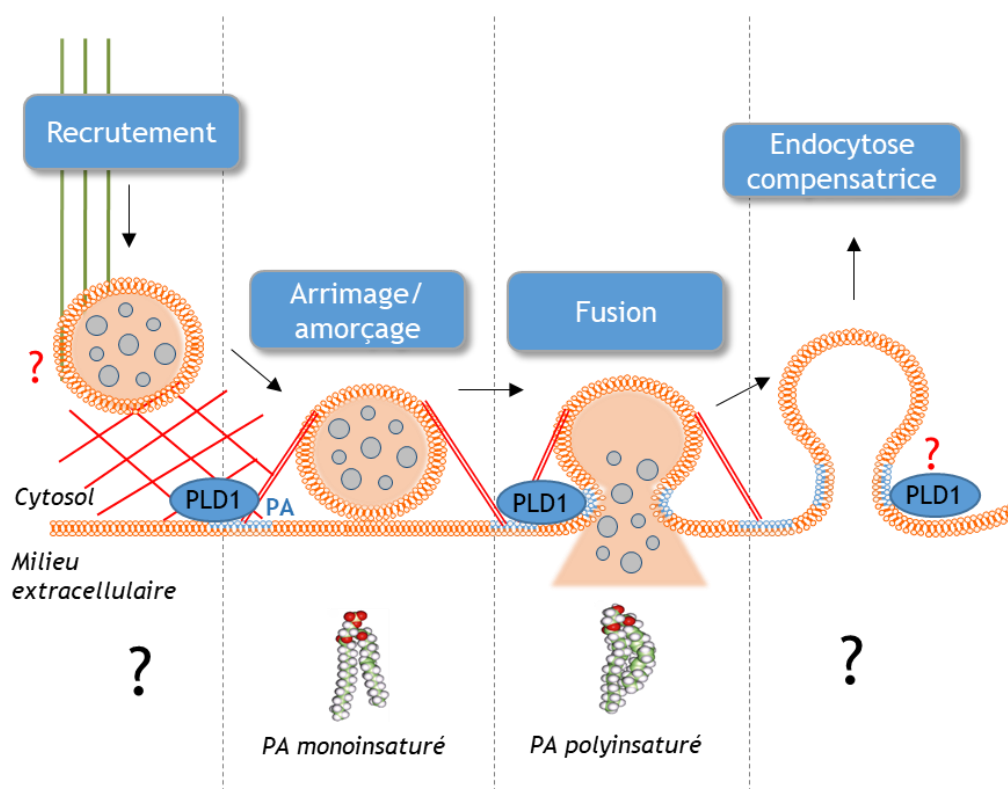


Figure 38 : Modèle simplifié de l'implication de la PLD1 et des différentes formes de PA dans les différentes étapes de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines

Par ailleurs, nos résultats montrent que plusieurs espèces de PA de type mono- ou polyinsaturés sont produites à la membrane plasmique au cours de l'exocytose et ils laissent envisager que ces formes de PA soient impliquées plus particulièrement dans l'une ou l'autre des étapes de la vie d'un granule de sécrétion. Ces résultats très encourageants valident l'hypothèse de fonctions variées pour différentes espèces d'un même lipide. Pour compléter ces données et identifier les cibles des PA, le développement de sondes spécifiques des différentes formes de PA est envisagé. Le PA étant métabolisé très rapidement, il sera également essentiel de tester l'effet de ses différents métabolites en réalisant les expériences de restauration décrites précédemment avec un apport de DAG, de LPA ou encore des acides gras mono- et polyinsaturés seuls.

Enfin, il est à souligner que nous avons également pu mettre en évidence que des formes de PA ayant une chaîne d'acide gras de nature oméga-3 sont produites au cours de la neurosécrétion ou du développement neuronal (Tanguy *et al.*, 2018b). Nos résultats laissent entrevoir un mode d'action spécifique dans la fusion membranaire de ces formes de PA. Puisque la littérature scientifique foisonne de résultats qui soutiennent un rôle des acides gras de type oméga-3 pour lutter contre le déclin cognitif sans que le mode d'action soit réellement compris, il serait à présent particulièrement intéressant de tester une implication du PA 40:6 dans la libération vésiculaire des neurotransmetteurs.

V. Matériel et Méthodes

A. Biologie moléculaire

Le plasmide codant pour la protéine de fusion NPY-RFP a été généré dans l'équipe par le Dr Stéphane Ory. Le vecteur a été amplifié suivant un protocole classique, incluant la transformation et la culture bactérienne, puis la purification des plasmides recombinants.

Après avoir ajouté environ 100 ng de plasmide à 50 μ l de bactéries *Escherichia coli* compétentes (souche DH5 α), le mélange est incubé 20 minutes sur glace. L'entrée du plasmide est provoquée par un choc thermique appliqué à 42°C pendant 45 secondes, puis les bactéries sont replacées sur glace pendant 2 minutes. Les bactéries sont alors incubées dans 1 ml de milieu de culture LB (*lysogeny broth*) à 37°C pendant 1 heure sous agitation, puis étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide et l'antibiotique nécessaire à la sélection des clones. Après une incubation d'au moins 12 heures à 37°C, les colonies résultant de la transformation sont amplifiées en milieu LB liquide contenant l'antibiotique de sélection durant une nuit à 37°C sous agitation. La purification des plasmides recombinants est ensuite réalisée en suivant le protocole du kit *Qiagen endotoxin free*. La densité optique de l'échantillon est mesurée à 260 et 280 nm afin de déterminer la concentration et la pureté du plasmide. Si le rapport 260/280 est supérieur ou égal à 1,7 et que la concentration est d'au moins 1 μ g/ μ l, nous estimons que le plasmide est utilisable pour une transfection.

B. Culture cellulaire et transfection

1. Culture primaire des cellules chromaffines bovines (CCB)

L'isolation des CCB à partir de la médullosurrénale de bœuf et les conditions de culture utilisées sont décrites en détail dans l'article joint en annexe (*Thahouly et al.*, en soumission dans le journal *Methods in Molecular Biology*). Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre recouvertes de fibronectine à raison de 250 000 cellules/lamelle et utilisées dans les trois jours après leur mise en culture pour les expériences d'immunofluorescence ou après une semaine pour la préparation des feuillets de membrane plasmique.

2. Lignée cellulaire PC12 (phéochromocytome de rat)

La lignée PC12 est une lignée cellulaire adhérente obtenue chez le rat et provenant d'un phéochromocytome, une tumeur de la glande médullosurrénale. Nous utilisons ces cellules en parallèle de la culture primaire de cellules chromaffines, car elles présentent notamment l'avantage de pouvoir être transfectées plus efficacement.

a. Entretien de la culture et ensemencements

Les cellules PC12 sont cultivées en boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre dans du milieu DMEM contenant 4,5 g/l de glucose et 30 mM de NaHCO₃ (*Sigma, D5796*), supplémenté avec 5%

de sérum de veau fœtal, 10% de sérum de cheval et 1% d'un mélange d'antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) pour obtenir du milieu complet. Lors du passage hebdomadaire, les cellules confluentes sont dissociées du support par une incubation de quelques minutes avec de la trypsine à température ambiante (*Gibco*). Après ajout de milieu complet afin d'inactiver la trypsine, la suspension cellulaire est centrifugée 5 minutes à 800 rpm et le culot est resuspendu dans du milieu complet. Les cellules sont ensemencées à la dilution 1/40 dans du milieu complet puis sont placées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Un renouvellement du milieu est effectué 4 jours après le passage.

Pour réaliser les expériences, les cellules PC12 sont ensemencées dans des microplaques 8 puits à fond de verre (*IBIDI*) à hauteur de 70 000 cellules/puits pour la vidéomicroscopie, ou sur des lamelles de verre à hauteur de 200 000 cellules/lamelle pour l'immunofluorescence. Les supports sont préalablement recouverts de poly-L-lysine à 10 µg/ml (PLL, *Sigma*).

b. Transfection des cellules par lipofection

La lipofection ou transfection par agent lipidique consiste à inclure des acides nucléiques dans des structures micellaires, des liposomes, qui grâce à leurs propriétés structurales analogues à celles des membranes cellulaires peuvent alors fusionner avec elles et libérer leur contenu dans la cellule.

La transfection des cellules PC12 est effectuée le lendemain de l'ensemencement, lorsque les cellules ont atteint 70 à 90% de confluence. Une heure avant la transfection, le milieu est remplacé par du milieu Opti-MEM, appauvri en sérum (*Gibco*). Pour chaque transfection, l'ADN est complexé avec un agent lipidique, la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*). L'ADN et la Lipofectamine sont tout d'abord dilués séparément dans l'Opti-MEM (25 µl/puits ou 50 µl/lamelle) à raison de 0,4 µg d'ADN et 1 µl de Lipofectamine/puits, ou 0,8 µg d'ADN et 2 µl de Lipofectamine/lamelle. Les deux solutions sont ensuite mélangées et incubées 5 à 10 minutes à température ambiante. Le complexe acide nucléique-Lipofectamine est ajouté aux cellules à raison de 50 µl/puits ou 100 µl/lamelle. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂, et le milieu Opti-MEM est remplacé 4 à 6 heures après la transfection par du milieu complet. Les cellules sont utilisées 24 à 48 heures après la transfection. L'efficacité de transfection se situe entre 50 et 80%.

C. Produits chimiques utilisés

Le FIPI (*Tocris*) est resuspendu dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 7,5 mM, aliquoté en flacons de verre pour un usage unique et conservé à 4°C à l'abri de l'humidité. Cette solution stock est diluée extemporanément à 750 nM dans du Locke Normal (LN) (NaCl 140 mM ; KCl 4,7 mM ; CaCl₂ 2,5 mM ; KH₂PO₄ 1,2 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; acide éthylène-diamino-

tétraacétique (EDTA) 0,01 mM ; HEPES 15 mM ; glucose 11 mM ; acide ascorbique 0,56 mM ; pH 7,5) et les cellules sont préincubées une heure avec cette solution pour les expériences.

D. *Imagerie sur cellules vivantes et analyses post-acquisition*

1. *Vidéomicroscopie au microscope confocal à spinning disk*

Dans les 48 heures après la transfection, les cellules PC12 exprimant la construction NPY-RFP sont observées avec un objectif à immersion 100x à l'aide d'un microscope confocal à *spinning disk* (Zeiss Axio Observer Z1, adapté sur une tête confocale Yokogawa CSU X1). Les cellules sont rincées deux fois dans du LN, puis incubées une heure à 37°C dans 150 µl de LN/puits contenant un inhibiteur de PLD (FIPI) ou du DMSO (véhicule). Elles sont ensuite placées sur une platine chauffée à 37°C, et dans une chambre à atmosphère humide également à cette température. Les acquisitions sont effectuées à une longueur d'onde d'excitation de 561 nm en minimisant l'intensité du laser entre 5 et 10%. Des acquisitions tridimensionnelles (*stack*) sont effectuées afin d'obtenir des coupes virtuelles d'une épaisseur de 0,3 µm sur toute la hauteur de la cellule (**figure 39A**). Des enregistrements d'une minute sont effectués, chaque *stack* étant séparé de 630 ms.

2. *Suivi des trajectoires et analyse des données*

Les analyses de trajectoire ont été réalisées à l'aide du logiciel Icy (**figure 39B**). La segmentation est effectuée à l'aide du plugin Spot Detector afin de détecter les granules marqués. Après ajustement des paramètres de détection, entre 100 et 300 granules sont détectés sur le *stack* pris au temps t=0. Le suivi de trajectoire (*tracking*) est réalisé grâce au plugin *Spot tracking*, couplé au plugin *Track Manager* pour l'extraction des paramètres de déplacement et de vitesse, dont le déplacement quadratique moyen (*mean square displacement*, MSD). Seuls les granules suivis sur plus de 30 secondes en continu ont été conservés pour l'analyse.

Trois types de mouvement ont été identifiés auparavant dans les cellules chromaffines et PC12 (**figure 39C**). Un filtrage a alors été effectué selon l'ampleur (*extent*) de la trajectoire pour extraire les données correspondant à une population de granules au mouvement de type cagé (*extent* < 0,5 µm) ou dirigé (*extent* > 2,5 µm). Un dernier filtrage a été effectué suivant la pente du MSD, caractéristique du type de mouvement (**figure 39D**).

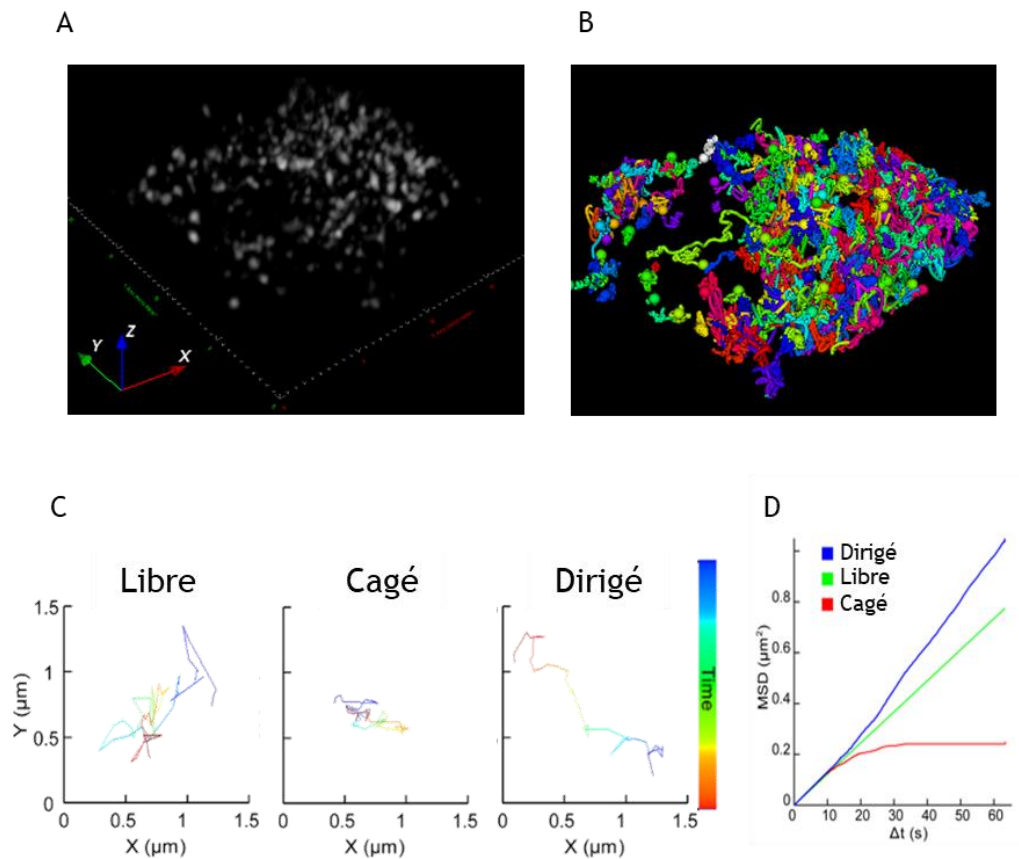


Figure 39 : Méthode d'analyse des mouvements des granules de sécrétion

A) Visualisation 3D d'une cellule PC12 exprimant la construction NPY-RFP

Dans les 48 heures après la transfection, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope confocal à *spinning disk*. Les cellules sont placées à 37°C et des acquisitions tridimensionnelles sont réalisées à un intervalle de 630 ms durant 1 minute.

B) Exemple d'image obtenue après le protocole de tracking

Les vidéos sont analysées sur le logiciel Icy. Les spots fluorescents représentant les granules marqués avec le NPY-RFP sont détectés sur le plan à temps $t=0$, puis le trajet des granules est déterminé en 3D grâce à un protocole de suivi des trajectoires (*tracking*).

C) et D) Illustration des paramètres différenciant les trois populations de granules présentes dans les cellules chromaffines

(Adapté de Maucort et al., 2014)

Au repos ou en condition stimulée, les granules de sécrétion sont répartis en trois populations qui se distinguent par un mouvement de type libre, cagé ou dirigé. L'aspect général de la courbe du MSD en fonction du temps est différent en fonction du type de mouvement.

E. Suivi de l'internalisation de la DBH par immunofluorescence

1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé pour mesurer l'internalisation de la DBH est illustré **figure 40**. Les CCB sont lavées deux fois avec une solution de LN, puis incubées 10 minutes à 37°C dans une solution de LN (condition repos), ou une solution de LN contenant 10 μM de nicotine (condition stimulée). Les cellules sont ensuite placées sur glace et lavées rapidement avec une

solution de LN froid, puis incubées 1 heure à 4°C dans une solution de LN froid contenant un anticorps anti-DBH à la dilution 1/1000. Elles sont ensuite rapidement rincées au LN, et sont soit fixées pour les conditions repos et stimulée seule, soit incubées à 37°C durant 5 ou 30 minutes pour les conditions d'internalisation de la DBH. Pour tester l'effet du FIPI sur l'endocytose, le milieu d'incubation contient 750 nM de FIPI ou 0,01% de DMSO (contrôle). Après 3 lavages rapides avec une solution de LN, les cellules sont fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) durant 15 minutes à température ambiante, puis perméabilisées durant 10 minutes à température ambiante avec une solution de PBS contenant 4% de PFA et 0,1% de Triton X-100.

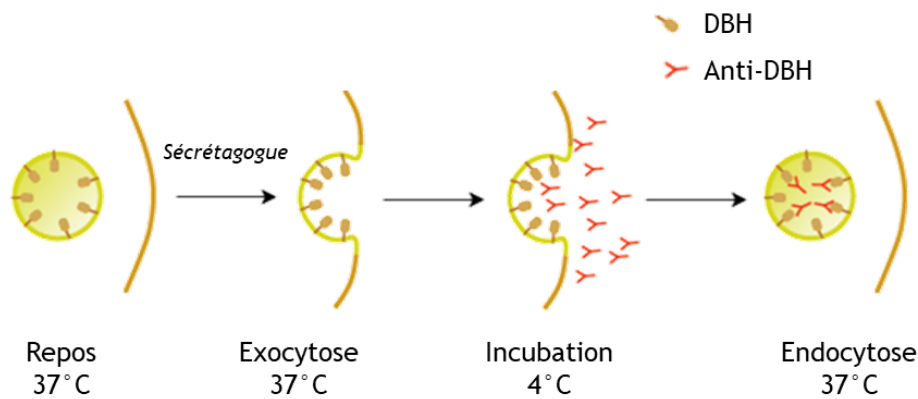


Figure 40 : Protocole général du test d'internalisation de la DBH
(thèse de Fanny Mombosse)

Suite à la stimulation de l'exocytose, les granules vont fusionner avec la membrane plasmique et la DBH se trouve alors en contact avec le milieu extracellulaire. Les cellules sont incubées avec des anticorps ciblant la DBH, à une température de 4°C afin de stopper toute activité cellulaire. Puis elles sont replacées à 37°C afin de déclencher le processus d'endocytose. Il est ensuite possible de suivre la position de ces vésicules à différents temps en effectuant un immunomarquage.

2. Immunocytochimie

Après 6 lavages au PBS, la saturation des sites aspécifiques est effectuée durant une nuit à 4°C avec une solution de PBS contenant 3% de BSA et 10% de sérum de chèvre. Les cellules sont ensuite incubées une heure à 37°C avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa-488. Les lamelles sont lavées 6 fois avec du PBS, puis les filaments d'actine sont révélés grâce à une incubation de 30 minutes à l'obscurité avec la phalloïdine-TRITC (tétraméthylrhodamine B isothiocyanate) (*Sigma*) diluée 2000 fois dans du PBS. Un marquage au Hoechst (*ThermoFisher*) est également réalisé dans les mêmes conditions afin de visualiser les noyaux. Après 6 rinçages au PBS, les lamelles sont rapidement rincées à l'eau, puis montées sur une lame dans un milieu de montage Elvanol-Mowiol (Mowiol 4-88, France Biochem 85), adapté à l'observation en microscopie confocale.

3. Acquisitions au microscope confocal

Les acquisitions sont effectuées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Leica TCS SP5 II) avec le programme LAS AF (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence*). Les coupes virtuelles sont réalisées au niveau du plan médian de la cellule avec un objectif x63, d'ouverture numérique 1,4. Afin de pouvoir comparer plusieurs conditions, toutes les images ont été acquises avec les mêmes réglages. Les marquages fluorescents sont visualisés à l'aide de différents lasers capables d'exciter les fluorophores à des longueurs d'onde de 405 nm (Hoechst), 488 nm (Alexa-488), et 543 nm (TRITC). Le *pinhole* utilisé est de 1 Unité d'Airy et les images sont générées en 8 bits.

4. Analyses des images et quantification

Après acquisition des images, une quantification du nombre de spots fluorescents internalisés a été réalisée avec le logiciel Icy, en utilisant une approche de carte de distance euclidienne (*euclidean distance map*, EDM) développée auparavant dans le laboratoire par le Dr Stéphane Ory (*Ceridono et al., 2011*). L'EDM est une méthode utilisée en biologie cellulaire pour mesurer la distance entre deux objets. Le principe de cette technique de quantification est basé sur la transformation euclidienne des distances qui convertit une image digitale binaire constituée de pixels en une autre image où chaque pixel possèdera une valeur de distance euclidienne minimale par rapport à un point donné (**figure 41**). Un contour de la périphérie cellulaire est effectué grâce au marquage de l'actine-F par la phalloïdine, puis une image binaire obtenue à partir de cette sélection permet de créer une carte de distances euclidiennes de la cellule d'intérêt. Parallèlement, l'acquisition de départ est traitée par un seuillage afin de diminuer le bruit de fond, puis par une étape de segmentation qui va permettre d'isoler les spots fluorescents, qui seront alors transformés en région d'intérêt. Ces régions d'intérêt seront ensuite rapportées sur la carte de distance euclidienne précédemment obtenue. Chacune possèdera une valeur relative correspondant à sa distance par rapport à la membrane plasmique. Cette technique nous permet donc d'évaluer l'internalisation des spots présentant un marquage DBH, à partir de la membrane plasmique jusqu'à la région périnucléaire (valeurs de 0 à 90). Les cellules en condition stimulée seule présentent des vésicules se situant entre 0 et 15. Les spots possédant une valeur supérieure à 15 sont ainsi considérés comme internalisés.

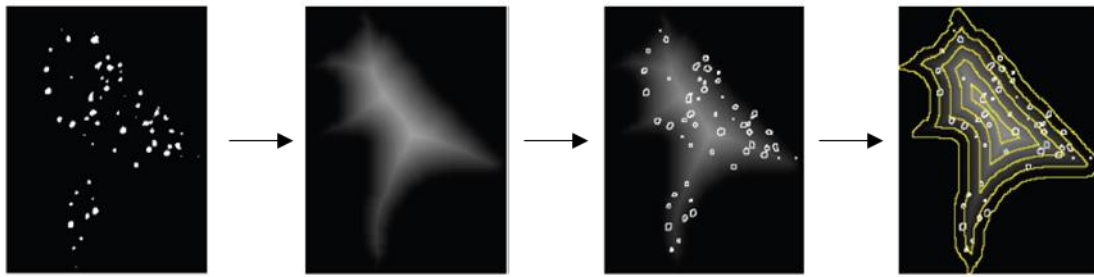


Figure 41 : Méthode de quantification de l'endocytose compensatrice grâce à la méthode de carte de distance euclidienne (EDM)
(thèse de Fanny Momboisse)

Le protocole d'internalisation de la DBH est suivi d'une immunocytochimie permettant de détecter les vésicules internalisées grâce à un anticorps secondaire fluorescent ciblant les anti-DBH. Chaque acquisition prise au microscope confocal est transformée en une carte de distance euclidienne comportant des valeurs de niveau de gris, avec un minimum au niveau de la membrane plasmique. Après un traitement de seuillage et de segmentation de l'acquisition, les spots détectés sont reportés sur la carte de distance euclidienne. Chaque vésicule possèdera ainsi une valeur de distance relative par rapport à la membrane. Les vésicules avec une valeur >15 sont considérées comme internalisées.

F. Observation de feuilletts membranaires en microscopie électronique

Cette technique permet de visualiser à l'échelle ultrastructurale la face interne de la membrane plasmique d'une cellule, ainsi que les organites et molécules qui y sont rattachés. Elle permet notamment d'observer l'organisation latérale des sites d'exocytose.

1. Préparation de feuilletts de membrane plasmique

Les cellules sont préalablement stimulées avec une solution dépolarisante de potassium (K^+ 59 mM : solution de LN contenant 59 mM de KCl et 86,9 mM de NaCl, pH 7,2) durant 10 minutes à 37°C. À la fin de la stimulation, des grilles de microscopie électronique en nickel recouvertes de Formvar et fixées sur des lamelles de verre sont déposées sur les cellules. Une forte pression est appliquée sur ces grilles à l'aide d'un bouchon de liège pendant 20 secondes afin d'entraîner l'adhésion des cellules aux grilles. Les grilles sont ensuite retirées, arrachant des fragments de la membrane plasmique des cellules. L'ensemble du processus est réalisé en moins de 30 secondes, et permet l'obtention de feuilletts de membrane plasmique du haut de la cellule, dont la face cytoplasmique se trouve vers le haut et peut ainsi être observée (**figure 42**). Les feuilletts sont ensuite fixés dans du PBS-PFA à 2% pendant 10 minutes à 4°C.

2. Immunocytochimie et observation au microscope

Après saturation des sites aspécifiques avec du PBS contenant 1% de BSA et 1% de BSA acétylée, un immunomarquage est réalisé avec un anticorps primaire anti-actine et est révélé avec un anticorps secondaire couplé à des billes d'or colloïdal de 15 nm de diamètre. Après fixation au glutaraldéhyde 2,5% dans du PBS, les échantillons sont post-fixés avec 1% de tétroxyde

d'osmium (OsO_4), déshydratés à l'éthanol par plusieurs bains de degrés alcooliques croissants, traités à l'hexaméthylsilazane et séchés à l'air. Les observations sont réalisées grâce à un microscope électronique à transmission Hitachi 7500.

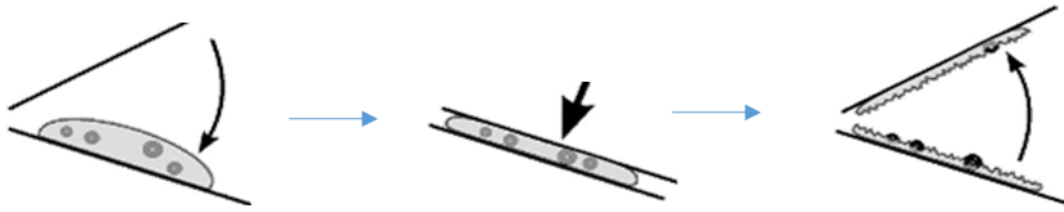


Figure 42 : Préparation de feuilletts de membrane plasmique
(Adapté de *Demais et al., 2016*)

Suite à la stimulation de l'exocytose, des grilles de microscopie électronique recouvertes de Formvar sont déposées sur les cellules, avant d'appliquer une pression de 20s sur ces grilles. Les grilles sont ensuite retirées, ce qui rompt la membrane plasmique et permet d'obtenir les feuilletts. La face cytoplasmique des cellules étant exposée vers le haut, ces feuilletts membranaires peuvent ensuite être observés au microscope électronique afin de visualiser les sites d'exocytose.

Conclusion générale

De plus en plus d'études montrent aujourd'hui l'importance de certains lipides membranaires dans divers processus cellulaires impliquant des étapes de trafic membranaire, tels que l'exocytose et l'endocytose. Mes travaux de thèse se sont focalisés sur le plus simple des phospholipides, l'acide phosphatidique (PA), et sa formation par la phospholipase D (PLD). J'ai étudié en parallèle deux processus de trafic : l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines de la glande surrénale, ainsi que la phagocytose dans les macrophages. Depuis que l'implication du PA formé par les PLD a été mise en évidence dans les processus de trafic membranaire, de nombreuses hypothèses subsistent pour expliquer ses fonctions. Mes travaux ont ainsi contribué à élargir nos connaissances sur l'implication de la PLD dans les processus d'exo-endocytose, d'une part en précisant la signalisation menant à l'activation des PLD lors de la phagocytose, et d'autre part en identifiant les étapes de la sécrétion pouvant être modulées par l'activité de la PLD.

Bien que nous ayons pu mieux définir les rôles du PA, le défi majeur restant à relever à l'heure actuelle consiste à comprendre les mécanismes d'actions de ce lipide au niveau moléculaire. Ces lacunes proviennent essentiellement d'un manque d'outils moléculaires adaptés à l'étude des lipides par les approches puissantes de la biologie moderne. Une partie de mon travail a notamment permis de caractériser des senseurs du PA qui permettront très probablement des avancées majeures par la suite. Grâce à l'utilisation de ceux-ci, nous avons pu faire des découvertes importantes dans la compréhension du mode d'interaction protéine-PA et la mise au point qui en découle pour la production de senseurs moléculaires. L'utilisation de ces sondes nous a également permis de progresser dans l'étude de la dynamique du PA. Sur la base des sondes que nous avons caractérisées, des outils permettant des analyses plus approfondies sont actuellement en cours de développement dans notre équipe. Ils comprennent d'une part des enzymes régulatrices du métabolisme du PA et des sondes photoactivables, permettant de contrôler la synthèse et la visualisation du PA par la lumière après le déclenchement d'un processus précis, et d'autre part différentes espèces de PA également dégageables par la lumière et pouvant lier de manière covalente leurs cibles, qui pourront ensuite être identifiées.

D'un point de vue physiologique, comprendre les mécanismes de défense contre les agents pathogènes est tout aussi fondamental que de mieux appréhender les mécanismes de libération des hormones. Ces deux systèmes sont par ailleurs en interconnexion dans notre organisme, les hormones du stress pouvant ainsi affecter la capacité de phagocytose des macrophages. De plus, ces deux systèmes, neuroendocrine et immunitaire, ne sont pas très éloignés au niveau du mode d'action. En effet, ils permettent tous deux d'adapter l'activité d'un organisme à son environnement, en transmettant des ordres à l'échelle cellulaire pour le premier et en éliminant des menaces directes pour l'autre. De même, dans les cellules chromaffines comme dans les

macrophages, les processus d'exocytose et d'endocytose sont indissociables pour que ces cellules puissent assurer leurs fonctions.

Pour terminer, l'un des résultats majeurs de ma thèse suggère, pour la première fois, un rôle différent des formes mono- ou polyinsaturées du PA dans la libération des hormones. Ces résultats novateurs valident l'hypothèse de fonctions variées pour différentes formes d'un seul lipide, tout en laissant entrevoir de nouvelles explications biologiques aux fonctions des acides gras insaturés, notamment de type oméga-3, dans les systèmes nerveux et endocrinien. Il sera également particulièrement intéressant de déterminer par la suite les fonctions de ces différentes formes de PA dans la phagocytose.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

A

- Abousalham A, Liossis C, O'Brien L, Brindley DN (1997) Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA. *J Biol Chem* 272:1069-1075.
- Abousalham A, Riviere M, Teissere M, Verger R (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim Biophys Acta* 1158:1-7.
- Abramovici H, Mojtabaie P, Parks RJ, Zhong X-P, Koretzky GA, Topham MK, Gee SH (2009) Diacylglycerol kinase ζ regulates actin cytoskeleton reorganization through dissociation of Rac1 from RhoGDI. *Mol Biol Cell* 20:2049-2059.
- Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
- Agwu DE, McPhail LC, Chabot MC, Daniel LW, Wykle RL, McCall CE (1989) Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 264:1405-1413.
- Ailte I, Lingelem ABD, Kvalvaag AS, Kavaliauskiene S, Brech A, Koster G, Dommersnes PG, Bergan J, Skotland T, Sandvig K (2017) Exogenous lysophospholipids with large head groups perturb clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 18:176-191.
- Akizuki S, Ishigaki K, Kochi Y, Law S-M, Matsuo K, Ohmura K, Suzuki A, Nakayama M, Iizuka Y, Koseki H, Ohara O, Hirata J, Kamatani Y, Matsuda F, Sumida T, Yamamoto K, Okada Y, Mimori T, Terao C (2019) PLD4 is a genetic determinant to systemic lupus erythematosus and involved in murine autoimmune phenotypes. *Ann Rheum Dis* 78:509-518.
- Almeida CG, Yamada A, Tenza D, Louvard D, Raposo G, Coudrier E (2011) Myosin 1b promotes the formation of post-Golgi carriers by regulating actin assembly and membrane remodelling at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 13:779-789.
- Altschuler Y, Liu S-H, Katz L, Tang K, Hardy S, Brodsky F, Apodaca G, Mostov K (1999) ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 147:7-12.
- Amatore C, Arbault S, Bouret Y, Guille M, Lemaître F, Verchier Y (2006) Regulation of exocytosis in chromaffin cells by trans-insertion of lysophosphatidylcholine and arachidonic acid into the outer leaflet of the cell membrane. *ChemBiochem* 7:1998-2003.
- Ammar M-R, Humeau Y, Hanauer A, Nieswandt B, Bader M-F, Vitale N (2013) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neurite outgrowth through phosphorylation of phospholipase D1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid. *J Neurosci* 33:19470-19479.
- Ammar M-R, Kassas N, Bader M-F, Vitale N (2014) Phosphatidic acid in neuronal development: a node for membrane and cytoskeleton rearrangements. *Biochimie* 107 Pt A:51-57.
- Amor JC, Harrison DH, Kahn RA, Ringe D (1994) Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* 372:704-708.
- Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, Romero G (2002) The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Letters* 531:65-68.
- 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, Raetz CRH, Russell DW, Subramaniam S, Dennis EA (2010) Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J Lipid Res* 51:2785-2797.
- Anthes JC, Eckel S, Siegel MI, Egan RW, Billah MM (1989) Phospholipase D in homogenates from HL-60 granulocytes: implications of calcium and G protein control. *Biochem Biophys Res Commun* 163:657-664.
- Anthes JC, Wang P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM (1991) Granulocyte phospholipase D is activated by a guanine nucleotide dependent protein factor. *Biochem Biophys Res Commun* 175:236-243.
- Aoki J, Inoue A, Okudaira S (2008) Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 1781:513-518.

- Araki N (2006) Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Front Biosci* 11:1479-1490.
- Araki N, Johnson MT, Swanson JA (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135:1249-1260.
- Arneson LS, Kunz J, Anderson RA, Traub LM (1999) Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes. *J Biol Chem* 274:17794-17805.
- Athenstaedt K, Daum G (1999) Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur J Biochem* 266:1-16.
- Aunis D, Langley K (1999) Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* 167:89-97.

B

- Bader M-F, Ciesielski-Treska J, Thierse D, Hesketh JE, Aunis D (1981) Immunocytochemical study of microtubules in chromaffin cells in culture and evidence that tubulin is not an integral protein of the chromaffin granule membrane. *J Neurochem* 37:917-933.
- Bader M-F, Doussau F, Chasserot-Golaz S, Vitale N, Gasman S (2004) Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1742:37-49.
- Bader M-F, Holz RW, Kumakura K, Vitale N (2002) Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann N Y Acad Sci* 971:178-183.
- Bader M-F, Vitale N (2009) Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1791:936-941.
- Baillie GS, Huston E, Scotland G, Hodgkin M, Gall I, Peden AH, MacKenzie C, Houslay ES, Currie R, Pettitt TR, Walmsley AR, Wakelam MJO, Warwicker J, Houslay MD (2002) TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca²⁺-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. *J Biol Chem* 277:28298-28309.
- Balboa MA, Firestein BL, Godson C, Bell KS, Insel PA (1994) Protein kinase C alpha mediates phospholipase D activation by nucleotides and phorbol ester in Madin-Darby canine kidney cells. Stimulation of phospholipase D is independent of activation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C and phospholipase A2. *J Biol Chem* 269:10511-10516.
- Balboa MA, Insel PA (1995) Nuclear phospholipase D in Madin-Darby canine kidney cells. Guanosine 5'-O-(thiotriphosphate)-stimulated activation is mediated by RhoA and is downstream of protein kinase C. *J Biol Chem* 270:29843-29847.
- Baldassare JJ, Jarpe MB, Alferes L, Raben DM (1997) Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J Biol Chem* 272:4911-4914.
- Banno Y, Fujita H, Ono Y, Nakashima S, Ito Y, Kuzumaki N, Nozawa Y (1999) Differential phospholipase D activation by bradykinin and sphingosine 1-phosphate in NIH 3T3 fibroblasts overexpressing gelsolin. *J Biol Chem* 274:27385-27391.
- Banno Y, Tamiya-Koizumi K, Oshima H, Morikawa A, Yoshida S, Nozawa Y (1997) Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF)- and oleate-dependent phospholipase D (PLD) in rat liver cells. Increases of ARF-dependent PLD activity in regenerating liver cells. *J Biol Chem* 272:5208-5213.
- Bard F, Malhotra V (2006) The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:439-455.
- Beaumelle B, Tóth P, Malak OA, Chopard C, Loussouarn G, Vitale N (2017) Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-mediated pathophysiological effect of HIV-1 Tat protein. *Biochimie* 141:80-85.
- Becker KP, Hannun YA (2005) Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 62:1448-1461.

Références bibliographiques

- Becker T, Volchuk A, Rothman JE (2005) Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4022-4026.
- Béglé A, Tryoen-Tóth P, de Barry J, Bader M-F, Vitale N (2009) ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 284:4836-4845.
- Benhamou M, Ryba NJP, Kihara H, Nishikata H, Siraganian RP (1993) Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* 268:23318-23324.
- Benistant C, Rubin R (1990) Ethanol inhibits thrombin-induced secretion by human platelets at a site distinct from phospholipase C or protein kinase C. *Biochem J* 269:489-497.
- Besterman JM, Duronio V, Cuatrecasas P (1986) Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6785-6789.
- Bi K, Roth MG, Ktistakis NT (1997) Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Curr Biol* 7:301-307.
- Bigay J, Antonny B (2012) Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev Cell* 23:886-895.
- Billah MM, Eckel S, Mullmann TJ, Egan RW, Siegel MI (1989) Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J Biol Chem* 264:17069-17077.
- Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D (1996) A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet* 12:385-389.
- Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-255.
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* 94:235-263.
- Blander JM, Medzhitov R (2006) On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol* 7:1029-1035.
- Boarder MR (1994) A role for phospholipase D in control of mitogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 15:57-62.
- Bobrovnikova-Marjon E, Pytel D, Riese MJ, Vaites LP, Singh N, Koretzky GA, Witze ES, Diehl JA (2012) PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to generate phosphatidic acid, mediate Akt activation, and promote adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 32:2268-2278.
- Bocckino SB, Blackmore PF, Wilson PB, Exton JH (1987) Phosphatidate accumulation in hormone-treated hepatocytes via a phospholipase D mechanism. *J Biol Chem* 262:15309-15315.
- Bohdanowicz M, Schlam D, Hermansson M, Rizzuti D, Fairn GD, Ueyama T, Somerharju P, Du G, Grinstein S (2013) Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Mol Biol Cell* 24:1700-1712, S1-7.
- Bokoch GM, Reilly AM, Daniels RH, King CC, Olivera A, Spiegel S, Knaus UG (1998) A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J Biol Chem* 273:8137-8144.
- Bollag WB, Barrett PQ, Isales CM, Liscovitch M, Rasmussen H (1990) A potential role for phospholipase-D in the angiotensin-II-induced stimulation of aldosterone secretion from bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 127:1436-1443.
- Bolomini-Vittori M, Mennens SFB, Joosten B, Franssen J, Du G, van den Dries K, Cambi A (2019) PLD-dependent phosphatidic acid microdomains are signaling platforms for podosome formation. *Sci Rep* 9:3556.
- Boncompain G, Divoux S, Gareil N, de Forges H, Lescure A, Latreche L, Mercanti V, Jollivet F, Raposo G, Perez F (2012) Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods* 9:493-498.
- Bonifacino JS (2014) Vesicular transport earns a Nobel. *Trends Cell Biol* 24:3-5.
- Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153-166.

- Booth JW, Trimble WS, Grinstein S (2001) Membrane dynamics in phagocytosis. *Semin Immunol* 13:357-364.
- Bosch RR, Smeets RLL, Sleutels F, Patel AMP, van Emst-de Vries SE, Joep J, de Pont JJHMM, Willems PHJM (1999) Concerted action of cytosolic Ca²⁺ and protein kinase C in receptor-mediated phospholipase D activation in Chinese hamster ovary cells expressing the cholecystokinin-A receptor. *Biochem J* 337:263-268.
- Botelho RJ, Grinstein S (2011) Phagocytosis. *Curr Biol* 21:R533-538.
- Botelho RJ, Scott CC, Grinstein S (2004) Phosphoinositide involvement in phagocytosis and phagosome maturation. *Curr Top Microbiol Immunol* 282:1-30.
- Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151:1353-1368.
- Bourgoin S, Grinstein S (1992) Peroxides of vanadate induce activation of phospholipase D in HL-60 cells. Role of tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 267:11908-11916.
- Bowman EP, Uhlinger DJ, Lambeth JD (1993) Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J Biol Chem* 268:21509-21512.
- Brandizzi F, Barlowe C (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:382-392.
- Braun V, Niedergang F (2006) Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biol Cell* 98:195-201.
- Brennwald P, Rossi G (2007) Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *FEBS Letters* 581:2119-2124.
- Brindley DN, Waggoner DW (1998) Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem* 273:24281-24284.
- Briscoe CP, Martin A, Cross M, Wakelam MJO (1995) The roles of multiple pathways in regulating bombesin-stimulated phospholipase D activity in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem J* 306:115-122.
- Brown FD, Thompson N, Saqib KM, Clark JM, Powner D, Thompson NT, Solari R, Wakelam MJO (1998) Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr Biol* 8:835-838.
- Brown HA, Gutowski S, Kahn RA, Sternweis PC (1995) Partial purification and characterization of Arf-sensitive phospholipase D from porcine brain. *J Biol Chem* 270:14935-14943.
- Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75:1137-1144.
- Brown HA, Sternweis PC (1995) Stimulation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor. *Methods Enzymol* 257:313-324.
- Brown HA, Thomas PG, Lindsley CW (2017) Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Drug Discov* 16:351-367.
- Brown SS (1999) Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:63-80.
- Bruhns P, Jönsson F (2015) Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* 268:25-51.
- Bruntz RC, Lindsley CW, Brown HA (2014a) Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Rev* 66:1033-1079.
- Bruntz RC, Taylor HE, Lindsley CW, Brown HA (2014b) Phospholipase D2 mediates survival signaling through direct regulation of Akt in glioblastoma cells. *J Biol Chem* 289:600-616.
- Brymora A, Valova VA, Larsen MR, Roufogalis BD, Robinson PJ (2001) The brain exocyst complex interacts with RalA in a GTP-dependent manner: identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene. *J Biol Chem* 276:29792-29797.

Références bibliographiques

- Buchanan FG, McReynolds M, Couvillon A, Kam Y, Holla VR, Dubois RN, Exton JH (2005) Requirement of phospholipase D1 activity in H-RasV12-induced transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1638-1642.
- Bullen HE, Jia Y, Yamaryo-Botté Y, Bisio H, Zhang O, Jemelin NK, Marq J-B, Carruthers V, Botté CY, Soldati-Favre D (2016) Phosphatidic acid-mediated signaling regulates microneme secretion in toxoplasma. *Cell Host Microbe* 19:349-360.
- Burd CG (2011) Physiology and pathology of endosome-to-Golgi retrograde sorting. *Traffic* 12:948-955.
- Burgoyne RD, Morgan A (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83:581-632.
- Burkhardt U, Stegner D, Hattingen E, Beyer S, Nieswandt B, Klein J (2014b) Impaired brain development and reduced cognitive function in phospholipase D-deficient mice. *Neurosci Letters* 572:48-52.
- Burkhardt U, Wojcik B, Zimmermann M, Klein J (2014a) Phospholipase D is a target for inhibition of astroglial proliferation by ethanol. *Neuropharmacology* 79:1-9.

C

- Cai D, Netzer WJ, Zhong M, Lin Y, Du G, Frohman M, Foster DA, Sisodia SS, Xu H, Gorelick FS, Greengard P (2006b) Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of beta-amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1941-1946.
- Cai D, Zhong M, Wang R, Netzer WJ, Shields D, Zheng H, Sisodia SS, Foster DA, Gorelick FS, Xu H, Greengard P (2006a) Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1936-1940.
- Cai S, Exton JH (2001) Determination of interaction sites of phospholipase D1 for RhoA. *Biochem J* 355:779-785.
- Campellone KG, Welch MD (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:237-251.
- Campelo F, Malhotra V (2012) Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu Rev Biochem* 81:407-427.
- Canton J, Neculai D, Grinstein S (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 13:621-634.
- Cantrell DA (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114:1439-45.
- Carrasco S, Mérida I (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* 32:27-36.
- Carréno S, Caron E, Cougoule C, Emorine LJ, Maridonneau-Parini I (2002) p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner. *J Biol Chem* 277:21007-21016.
- Cassetta L, Pollard JW (2018) Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 17:887-904.
- Castellano F, Chavrier P, Caron E (2001) Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol* 13:347-355.
- Caumont A-S, Galas M-C, Vitale N, Aunis D, Bader M-F (1998) Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J Biol Chem* 273:1373-1379.
- Caviston JP, Holzbaur ELF (2006) Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* 16:530-537.
- Cazzolli R, Shemon AN, Fang MQ, Hughes WE (2006) Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life* 58:457-461.
- Ceridono M, Ory S, Momboisse F, Chasserot-Golaz S, Houy S, Calco V, Haeberlé A-M, Demais V, Bailly Y, Bader M-F, Gasman S (2011) Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *Traffic* 12:72-88.

- Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Poüs C (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell* 12:2047-2060.
- Chae YC, Kim JH, Kim KL, Kim HW, Lee HY, Heo WD, Meyer T, Suh P-G, Ryu SH (2008) Phospholipase D activity regulates integrin-mediated cell spreading and migration by inducing GTP-Rac translocation to the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 19:3111-3123.
- Chae YC, Lee S, Lee HY, Heo K, Kim JH, Kim JH, Suh P-G, Ryu SH (2005) Inhibition of muscarinic receptor-linked phospholipase D activation by association with tubulin. *J Biol Chem* 280:3723-3730.
- Chalifa-Caspi V, Eli Y, Liscovitch M (1998) Kinetic analysis in mixed micelles of partially purified rat brain phospholipase D activity and its activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neurochem Res* 23:589-599.
- Chardin P, Paris S, Antonny B, Robineau S, Béraud-Dufour S, Jackson CL, Chabre M (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384:481-484.
- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader M-F (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16:1108-1119.
- Chavrier P, Goud B (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 11:466-475.
- Chen J, Fang Y (2002) A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem Pharmacol* 64:1071-1077.
- Chen J-S, Exton JH (2004) Regulation of phospholipase D2 activity by protein kinase C α . *J Biol Chem* 279:22076-22083.
- Chen Q, Hongu T, Sato T, Zhang Y, Ali W, Cavallo J-A, 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:ra79.
- Chen W-C, Wang W-C, Lu H-F, Okada Y, Chang W-P, Chou Y-H, Chang H-H, Huang J-D, Chen D-Y, Chang W-C (2017) rs2841277 (*PLD4*) is associated with susceptibility and rs4672495 is associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Oncotarget* 8:64180-64190.
- Chen Y-G, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung T-C, Frohman MA, Morris AJ, Shields D (1997) Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 138:495-504.
- Cherfils J, Zeghouf M (2013) Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93:269-309.
- Chernomordik L, Chanturiya A, Green J, Zimmerberg J (1995) The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition. *Biophys J* 69:922-929.
- Chernomordik LV, Kozlov MM (2003) Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* 72:175-207.
- Chernomordik LV, Kozlov MM (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:675-683.
- Chesarone MA, DuPage AG, Goode BL (2010) Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:62-74.
- Chevallier J, Chamoun Z, Jiang G, Prestwich G, Sakai N, Matile S, Parton RG, Gruenberg J (2008) Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J Biol Chem* 283:27871-27880.
- Chierregatti E, Meldolesi J (2005) Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:181-187.
- Cho JH, Oh D-Y, Kim H-J, Park S-Y, Choi H-J, Kwon S-J, Lee K-S, Han J-S (2011) The TSP motif in AP180 inhibits phospholipase D1 activity resulting in increased efficacy of anticancer drug via its direct binding to carboxyl terminal of phospholipase D1. *Cancer Letters* 302:144-154.
- Choi S-Y, 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* 8:1255-1262.
- Choi WS, Kim YM, Combs C, Frohman MA, Beaven MA (2002) Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. *J Immunol* 168:5682-5689.

Références bibliographiques

- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA (1994) The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79:507-513.
- Chung J-K, Sekiya F, Kang H-S, Lee C, Han J-S, Kim SR, Bae YS, Morris AJ, Rhee SG (1997) Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 272:15980-15985.
- Clatworthy MR, Smith KGC (2004) FcγRIIb balances efficient pathogen clearance and the cytokine-mediated consequences of sepsis. *J Exp Med* 199:717-723.
- Cockcroft S (1996) ARF-regulated phospholipase D: a potential role in membrane traffic. *Chem Phys Lipids* 80:59-80.
- Cockcroft S (1997) Phosphatidylinositol transfer proteins: requirements in phospholipase C signaling and in regulated exocytosis. *FEBS Letters* 410:44-48.
- Cockcroft S, Thomas GMH, Fensome A, Geny B, Cunningham E, Gout I, Hiles I, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ (1994) Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* 263:523-526.
- Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004) RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:355-366.
- Coleman RA, Lee DP (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43:134-176.
- Colley WC, Altshuller YM, Sue-Ling CK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Branch KD, Tsirka SE, Bollag RJ, Bollag WB, Frohman MA (1997a) Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem J* 326:745-753.
- Colley WC, Sung T-C, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuller Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA (1997b) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7:191-201.
- Cook SJ, Wakelam MJO (1992) Epidermal growth factor increases sn-1,2-diacylglycerol levels and activates phospholipase D-catalysed phosphatidylcholine breakdown in Swiss 3T3 cells in the absence of inositol-lipid hydrolysis. *Biochem J* 285:247-253.
- Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, Schreiber AD, Trimble WS, Anderson R, Grinstein S (2002) Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Iα impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem* 277:43849-43857.
- Corrotte M, Chasserot-Golaz S, Huang P, Du G, Ktistakis NT, Frohman MA, Vitale N, Bader M-F, Grant NJ (2006) Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* 7:365-377.
- Corrotte M, Tran Nguyen AP, Harlay ML, Vitale N, Bader M-F, Grant NJ (2010) Ral isoforms are implicated in FcγR-mediated phagocytosis: activation of phospholipase D by RalA. *J Immunol* 185:2942-2950.
- Cossart P, Helenius A (2014) Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016972.
- Cox D, Chang P, Kurosaki T, Greenberg S (1996) Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* 271:16597-16602.
- Cox D, Greenberg S (2001) Phagocytic signaling strategies: Fcγ receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol* 13:339-345.
- Cox D, Tseng C-C, Bjekic G, Greenberg S (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* 274:1240-1247.
- Cross MJ, Roberts S, Ridley AJ, Hodgkin MN, Stewart A, Claesson-Welsh L, Wakelam MJO (1996) Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Curr Biol* 6:588-597.
- Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VLJ, DeFranco AL (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J Exp Med* 186:1027-1039.
- Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, Cai Y, Guerreiro R, Harari O, Norton J, Budde J, Bertelsen S, Jeng AT, Cooper B, Skorupa T, Carrell D, Levitch D, Hsu S, Choi J, Ryten M, Sassi C, Bras J *et al.* (2014) Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature* 505:550-554.

- Czarny M, Fiucci G, Lavie Y, Banno Y, Nozawa Y, Liscovitch M (2000) Phospholipase D2: functional interaction with caveolin in low-density membrane microdomains. *FEBS Letters* 467:326-332.
- Czarny M, Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M (1999) Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-1₈₂₋₁₀₁. *J Biol Chem* 274:2717-2724.

D

- D'Souza-Schorey C, Chavrier P (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:347-358.
- D'Souza-Schorey C, Li G, Colombo MI, Stahl PD (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* 267:1175-1178.
- D'Souza-Schorey C, van Donselaar E, Hsu VW, Yang C, Stahl PD, Peters PJ (1998) ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol* 140:603-616.
- Daleke DL (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 44:233-242.
- Daniels RH, Hall PS, Bokoch GM (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J* 17:754-764.
- Darios F, Connell E, Davletov B (2007) Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol* 585:699-704.
- Dascher C, Balch WE (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 269:1437-1448.
- Davis PD, Hill CH, Keech E, Lawton G, Nixon JS, Sedgwick AD, Wadsworth J, Westmacott D, Wilkinson SE (1989) Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Letters* 259:61-63.
- de Diego AMG, Gandía L, García AG (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol* 192:287-301.
- de Forges H, Bouissou A, Perez F (2012) Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* 44:266-274.
- Decker C, Miro Obradors MJ, Sillence DJ, Allan D (1996) Phorbol ester-sensitive phospholipase D is mainly localized in the endoplasmic reticulum of BHK cells. *Biochem J* 320:885-890.
- Delon C, Manifava M, Wood E, Thompson D, Krugmann S, Pyne S, Ktistakis NT (2004) Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 279:44763-44774.
- Demais V, Barthélémy A, Perraut M, Ungerer N, Keime C, Reibel S, Pfrieder FW (2016) Reversal of pathologic lipid accumulation in NPC1-deficient neurons by drug-promoted release of LAMP1-coated lamellar inclusions. *J Neurosci* 36:8012-8025.
- Demel RA, Yin CC, Lin BZ, Hauser H (1992) Monolayer characteristics and thermal behaviour of phosphatidic acids. *Chem Phys Lipids* 60:209-223.
- Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, Magrioti V, Kokotos G (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 111:6130-6185.
- Desjardins M, Houde M, Gagnon E (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev* 207:158-165.
- Devaux PF, Herrmann A, Ohlwein N, Kozlov MM (2008) How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta* 1778:1591-1600.
- DeYonker NJ, Webster CE (2013) Phosphoryl transfers of the phospholipase D superfamily: a quantum mechanical theoretical study. *J Am Chem Soc* 135:13764-13774.
- Di Fulvio M, Frondorf K, Gomez-Cambronero J (2008) Mutation of Y¹⁷⁹ on phospholipase D2 (PLD2) upregulates DNA synthesis in a PI3K- and Akt-dependent manner. *Cell Signal* 20:176-185.

Références bibliographiques

- Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651-657.
- Diaz O, Berquand A, Dubois M, Di Agostino S, Sette C, Bourgoïn S, Lagarde M, Némoz G, Prigent A-F (2002) The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J Biol Chem* 277:39368-39378.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, Borges R (2008) Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol* 192:145-163.
- Dircks L, Sul HS (1999) Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis. *Prog Lipid Res* 38:461-479.
- Disse J, Vitale N, Bader M-F, Gerke V (2009) Phospholipase D1 is specifically required for regulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood* 113:973-980.
- Divecha N, Roefs M, Halstead JR, D'Andrea S, Fernandez-Borga M, Oomen L, Saqib KM, Wakelam MJO, D'Santos C (2000) Interaction of the type Ialpha PIPkinase with phospholipase D: a role for the local generation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the regulation of PLD2 activity. *EMBO J* 19:5440-5449.
- Donaldson JG (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278:41573-41576.
- Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD (1992) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360:350-352.
- Donaldson JG, Honda A (2005) Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans* 33:639-42.
- Donaldson JG, Jackson CL (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 12:475-482.
- Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, Bloom GS, Kreis TE, Klausner RD (1990) Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J Cell Biol* 111:2295-2306.
- Dowhan W (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem* 66:199-232.
- Du G, Altshuller YM, Kim Y, Han JM, Ryu SH, Morris AJ, Frohman MA (2000) Dual requirement for Rho and protein kinase C in direct activation of phospholipase D1 through G protein-coupled receptor signaling. *Mol Biol Cell* 11:4359-4368.
- Du G, Altshuller YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, Bader M-F, Frohman MA (2003) Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* 162:305-315.
- Dubyak GR, Schomisch SJ, Kusner DJ, Xie M (1993) Phospholipase D activity in phagocytic leucocytes is synergistically regulated by G-protein- and tyrosine kinase-based mechanisms. *Biochem J* 292:121-128.

E

- Earp HS, Huckle WR, Dawson TL, Li X, Graves LM, Dy R (1995) Angiotensin II activates at least two tyrosine kinases in rat liver epithelial cells. Separation of the major calcium-regulated tyrosine kinase from p125FAK. *J Biol Chem* 270:28440-28447.
- Eaton JM, Mullins GR, Brindley DN, Harris TE (2013) Phosphorylation of lipin 1 and charge on the phosphatidic acid head group control its phosphatidic acid phosphatase activity and membrane association. *J Biol Chem* 288:9933-9945.
- Egea-Jimenez AL, Zimmermann P (2018) Phospholipase D and phosphatidic acid in the biogenesis and cargo loading of extracellular vesicles. *J Lipid Res* 59:1554-1560.
- Ehrhart F, Roozen S, Verbeek J, Koek G, Kok G, van Kranen H, Evelo CT, Curfs LMG (2019) Review and gap analysis: molecular pathways leading to fetal alcohol spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 24:10-17.

- Eibl H, Kovatchev S (1981) Preparation of phospholipids and their analogs by phospholipase D. *Methods Enzymol* 72:632-639.
- Eldar H, Ben-Av P, Schmidt U-S, Livneh E, Liscovitch M (1993) Up-regulation of phospholipase D activity induced by overexpression of protein kinase C- α . Studies in intact Swiss/3T3 cells and in detergent-solubilized membranes in vitro. *J Biol Chem* 268:12560-12564.
- Ellson CD, Andrews S, Stephens LR, Hawkins PT (2002) The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci* 115:1099-1105.
- Elvers M, Stegner D, Hagedorn I, Kleinschnitz C, Braun A, Kuijpers MEJ, Boesl M, Chen Q, Heemskerk JWM, Stoll G, Frohman MA, Nieswandt B (2010) Impaired α (IIb) β (3) integrin activation and shear-dependent thrombus formation in mice lacking phospholipase D1. *Sci Signal* 3:ra1.
- Emoto M, Klarlund JK, Waters SB, Hu V, Buxton JM, Chawla A, Czech MP (2000) A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *J Biol Chem* 275:7144-7151.
- Evanko D (2005) Primer: spying on exocytosis with amperometry. *Nature Methods* 2:650.
- Exton JH (1997) New developments in phospholipase D. *J Biol Chem* 272:15579-15582.
- Exton JH (1999) Regulation of phospholipase D. *Biochim Biophys Acta* 1439:121-133.
- Exton JH (2000) Phospholipase D. *Ann N Y Acad Sci* 905:61-68.
- Exton JH (2002) Phospholipase D-structure, regulation and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 144:1-94.

F

- Fadeel B, Xue D (2009) The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44:264-277.
- Fagone P, Jackowski S (2009) Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res* 50:S311-S316.
- Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, Spener F, van Meer G, Wakelam MJO, Dennis EA (2009) Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 50:S9-S14.
- Faini M, Beck R, Wieland FT, Briggs JAG (2013) Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol* 23:279-288.
- Fairn GD, Grinstein S (2012) How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* 33:397-405.
- Fairn GD, Ogata K, Botelho RJ, Stahl PD, Anderson RA, De Camilli P, Meyer T, Wodak S, Grinstein S (2009) An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis. *J Cell Biol* 187:701-714.
- Fang Y, Park I-H, Wu A-L, Du G, Huang P, Frohman MA, Walker SJ, Brown HA, Chen J (2003) PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr Biol* 13:2037-2044.
- Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294:1942-1945.
- Fariás GG, Britt DJ, Bonifacino JS (2016) Imaging the polarized sorting of proteins from the Golgi complex in live neurons. *Methods Mol Biol* 1496:13-30.
- Feig LA (2003) Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* 13:419-425.
- Fensome A, Cunningham E, Prosser S, Tan SK, Swigart P, Thomas G, Hsuan J, Cockcroft S (1996) ARF and P115 restore GTP γ S-stimulated protein secretion from cytosol-depleted HL60 cells by promoting PIP2 synthesis. *Curr Biol* 6:730-738.
- Ferro-Novick S, Jahn R (1994) Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370:191-193.
- Firat-Karalar EN, Welch MD (2011) New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr Opin Cell Biol* 23:4-13.

Références bibliographiques

- Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL, Lowell CA (2000) Fcγ Receptor-Mediated Phagocytosis in Macrophages Lacking the Src Family Tyrosine Kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 191:669-682.
- Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7:61-98.
- Flores I, Casaseca T, Martinez-A C, Kanoh H, Merida I (1996) Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 271:10334-10340.
- Foster DA (2009) Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1791:949-955.
- Foster DA (2010) Reduced mortality and moderate alcohol consumption: the phospholipase D-mTOR connection. *Cell Cycle* 9:1291-1294.
- Foster DA, Xu L (2003) Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res* 1:789-800.
- Franc NC, White K (2000) Innate recognition systems in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. *Microbes Infect* 2:243-250.
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154:631-644.
- Freeman SA, Goyette J, Furuya W, Woods EC, Bertozzi CR, Bergmeier W, Hinz B, van der Merwe PA, Das R, Grinstein S (2016) Integrins form an expanding diffusional barrier that coordinates phagocytosis. *Cell* 164:128-140.
- Freeman SA, Grinstein S (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 262:193-215.
- Freeman SA, Vega A, Riedl M, Collins RF, Ostrowski PP, Woods EC, Bertozzi CR, Tammi MI, Lidke DS, Johnson P, Mayor S, Jaqaman K, Grinstein S (2018) Transmembrane pickets connect cyto- and pericellular skeletons forming barriers to receptor engagement. *Cell* 172:305-317.
- Freyberg Z, Bourgoin S, Shields D (2002) Phospholipase D2 is localized to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 13:3930-3942.
- Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, Shields D (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:943-955.
- Frohman MA (2015) The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 36:137-144.
- Frohman MA, Morris AJ (1999) Phospholipase D structure and regulation. *Chem Phys Lipids* 98:127-140.
- Frohman MA, Sung T-C, Morris AJ (1999) Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1439:175-186.
- Frolov VA, Shnyrova AV, Zimmerberg J (2011) Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004747.
- Fujiwara I, Takahashi S, Tadakuma H, Funatsu T, Ishiwata S (2002) Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol* 4:666-673.
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, Gutkind JS (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* 274:5868-5879.

G

- Gabel M, Delavoie F, Demais V, Royer C, Bailly Y, Vitale N, Bader M-F, Chasserot-Golaz S (2015) Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J Cell Biol* 210:785-800.
- Gabel M, Delavoie F, Royer C, Thahouly T, Gasman S, Bader M-F, Vitale N, Chasserot-Golaz S (2019) Phosphorylation cycling of Annexin A2 Tyr23 is critical for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1866:1207-1217.

- Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJM, Desjardins M (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110:119-131.
- Galas M-C, Helms JB, Vitale N, Thiersé D, Aunis D, Bader M-F (1997) Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem* 272:2788-2793.
- Galjart N (2010) Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol* 20:R528-R537.
- Ganesan R, Mahankali M, Alter G, Gomez-Cambroneiro J (2015) Two sites of action for PLD2 inhibitors: the enzyme catalytic center and an allosteric, phosphoinositide binding pocket. *Biochim Biophys Acta* 1851:261-272.
- Garcia A, Zheng Y, Zhao C, Toschi A, Fan J, Shraibman N, Brown HA, Bar-Sagi D, Foster DA, Arbiser JL (2008) Honokiol suppresses survival signals mediated by Ras-dependent phospholipase D activity in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 14:4267-4274.
- Garcia JGN, Fenton JW II, Natarajan V (1992) Thrombin stimulation of human endothelial cell phospholipase D activity. Regulation by phospholipase C, protein kinase C, and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Blood* 79:2056-2067.
- Garidel P, Johann C, Blume A (1997) Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH. *Biophys J* 72:2196-2210.
- Gaspar ML, Chang Y-F, Jesch SA, Aregullin M, Henry SA (2017) Interaction between repressor Opi1p and ER membrane protein Scs2p facilitates transit of phosphatidic acid from the ER to mitochondria and is essential for *INO1* gene expression in the presence of choline. *J Biol Chem* 292:18713-18728.
- Gaspard GJ, McMaster CR (2015) Cardiolipin metabolism and its causal role in the etiology of the inherited cardiomyopathy Barth syndrome. *Chem Phys Lipids* 193:1-10.
- Gavin AL, Huang D, Huber C, Martensson A, Tardif V, Skog PD, Blane TR, Thinnis TC, Osborn K, Chong HS, Kargaran F, Kimm P, Zeitjian A, Sielski RL, Briggs M, Schulz SR, Zarpellon A, Cravatt B, Pang ES, Teijaro J, de la Torre JC, O'Keeffe M, Hochrein H, Damme M, Teyton L, Lawson BR, Nemazee D (2018) PLD3 and PLD4 are single-stranded acid exonucleases that regulate endosomal nucleic-acid sensing. *Nat Immunol* 19:942-953.
- Geny B, Cockcroft S (1992) Synergistic activation of phospholipase D by protein kinase C- and G-protein-mediated pathways in streptolysin O-permeabilized HL60 cells. *Biochem J* 284:531-538.
- Ghim J, Moon J-S, Lee CS, Lee J, Song P, Lee A, Jang JH, Kim D, Yoon J-H, Koh YJ, Chelakkot C, Kang BJ, Kim J-M, Kim KL, Yang YR, Kim Y, Kim S-H, Hwang D, Suh P-G, Koh GY, Kong Y-Y, Ryu SH (2014) Endothelial deletion of phospholipase D2 reduces hypoxic response and pathological angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1697-1703.
- Ghosh S, Moore S, Bell RM, Dush M (2003) Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos. *J Biol Chem* 278:45690-45696.
- Ghosh S, Strum JC, Sciorra VA, Daniel L, Bell RM (1996) Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 271:8472-8480.
- Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, Slavík J, Machala M, Zimmermann P (2014) Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun* 5:3477.
- Gillingham AK, Munro S (2007) The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:579-611.
- Gilmore AP, Burrige K (1996) Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381:531-535.
- Gilson MK, Straatsma TP, McCammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1994) Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* 263:1276-1278.
- Giménez-Andrés M, Čopič A, Antonny B (2018) The many faces of amphipathic helices. *Biomolecules* 8:45.

Références bibliographiques

- Ginhoux F, Williams M (2016) Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity* 44:439-449.
- Goldschmidt HL, Tu-Sekine B, Volk L, Anggono V, Haganir RL, Raben DM (2016) DGK θ catalytic activity is required for efficient recycling of presynaptic vesicles at excitatory synapses. *Cell Rep* 14:200-207.
- Goley ED, Welch MD (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:713-726.
- Gomez-Cambronero J (2014) Phosphatidic acid, phospholipase D and tumorigenesis. *Adv Biol Regul* 54:197-206.
- Gómez-Muñoz A, Waggoner DW, O'Brien L, Brindley DN (1995) Interaction of ceramides, sphingosine, and sphingosine 1-phosphate in regulating dna synthesis and phospholipase d activity. *J Biol Chem* 270:26318-26325.
- Gonzalez-Baro MR, Coleman RA (2017) Mitochondrial acyltransferases and glycerophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1862:49-55.
- Gorter E, Grendel F (1925) On bimolecular layers of lipoids F the chromocytes of the blood. *J Exp Med* 41:439-443.
- Grant NJ, Demeneix B, Aunis D, Langley OK (1988) Induction of neurofilament phosphorylation in cultured chromaffin cells. *Neuroscience* 27:717-726.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.
- Griffiths G, Simons K (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234:438-443.
- Grill D, Matos ALL, de Vries WC, Kudruk S, Heflik M, Dörner W, Mootz HD, Jan Ravoo B, Galla H-J, Gerke V (2018) Bridging of membrane surfaces by annexin A2. *Sci Rep* 8:14662.
- Grimsey N, Han G-S, O'Hara L, Rochford JJ, Carman GM, Siniosoglou S (2008) Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J Biol Chem* 283:29166-29174.

H

- Ha KS, Exton JH (1993) Activation of actin polymerization by phosphatidic acid derived from phosphatidylcholine in IIC9 fibroblasts. *J Cell Biol* 123:1789-1796.
- Ha K-S, Yeo E-J, Exton JH (1994) Lysophosphatidic acid activation of phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase D and actin polymerization by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Biochem J* 303:55-59.
- Hammond SM, Altshuller YM, Sung T-C, Rudge SA, Rose K, Engebrecht 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: 29640-29643.
- Hammond SM, Jenco JM, Nakashima S, Cadwallader K, Gu Q, Cook S, Nozawa Y, Prestwich GD, Frohman MA, Morris AJ (1997) Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. *J Biol Chem* 272:3860-3868.
- Han JM, Kim JH, Lee BD, Lee SD, Kim Y, Jung YW, Lee S, Cho W, Ohba M, Kuroki T, Suh P-G, Ryu SH (2002) Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase D2 by protein kinase C delta in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 277:8290-8297.
- Hanahan DJ, Chaikoff IL (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.
- Hanahan DJ, Chaikoff IL (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* 172:191-198.

- Harayama T, Riezman H (2018) Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:281-296.
- Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, Stossel TP (1995) Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82:643-653.
- Hatsuzawa K, Tamura T, Hashimoto H, Hashimoto H, Yokoya S, Miura M, Nagaya H, Wada I (2006) Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* 17:3964-3977.
- Hauge C, Frödin M (2006) RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119:3021-3023.
- Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, Fulkerson Z, Albers HMG, van Meeteren LA, Houben A, van Zeijl L, Jansen S, Andries M, Hall T, Pegg LE, Benson TE, Kasiem M, Harlos K, Kooi CW, Smyth SS, Ovaas H, Bollen M, Morris AJ, Moolenaar WH, Perrakis A (2011) Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* 18:198-204.
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926-1945.
- Hayashi ML, Rao BSS, Seo J-S, Choi H-S, Dolan BM, Choi S-Y, Chattarji S, Tonegawa S (2007) Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11489-11494.
- Heissler SM, Sellers JR (2016) Various themes of myosin regulation. *J Mol Biol* 428:1927-1946.
- Henage LG, Exton JH, Brown HA (2006) Kinetic analysis of a mammalian phospholipase D: allosteric modulation by monomeric GTPases, protein kinase C, and polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 281:3408-3417.
- Henry SA, Kohlwein SD, Carman GM (2012) Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190:317-349.
- Hess JA, Ross AH, Qiu R-G, Symons M, Exton JH (1997) Role of Rho family proteins in phospholipase D activation by growth factors. *J Biol Chem* 272:1615-1620.
- Higgs HN, Glomset JA (1994) Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9574-9578.
- Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81:1159-1170.
- Hinchliffe KA, Ciruela A, Irvine RF (1998) PIPkins1, their substrates and their products: new functions for old enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1436:87-104.
- Hinkovska-Galcheva V, Boxer L, Mansfield PJ, Schreiber AD, Shayman JA (2003) Enhanced phagocytosis through inhibition of de novo ceramide synthesis. *J Biol Chem* 278:974-982.
- Hirama T, Lu SM, Kay JG, Maekawa M, Kozlov MM, Grinstein S, Fairn GD (2017) Membrane curvature induced by proximity of anionic phospholipids can initiate endocytosis. *Nat Commun* 8:1393.
- Hirata N, Takahashi M, Yazawa M (2009) Diphosphorylation of regulatory light chain of myosin IIA is responsible for proper cell spreading. *Biochem Biophys Res Commun* 381:682-687.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:682-696.
- Hiroshima M, Exton JH (2005) Localization and regulation of phospholipase D2 by ARF6. *J Cell Biochem* 95:149-164.
- Hodgkin MN, Clark JM, Rose S, Saqib K, Wakelam MJO (1999) Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem J* 339:87-93.
- Hodgkin MN, Masson MR, Powner D, Saqib KM, Ponting CP, Wakelam MJO (2000) Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain. *Curr Biol* 10:43-46.
- Hodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Michell RH, Pemberton AJ, Wakelam MJO (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 23:200-204.

Références bibliographiques

- Höer A, Cetindag C, Oberdisse E (2000) Influence of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human phospholipase D1 wild-type and deletion mutants: is there evidence for an interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with the putative pleckstrin homology domain? *Biochim Biophys Acta* 1481:189-201.
- Hofbauer HF, Gecht M, Fischer SC, Seybert A, Frangakis AS, Stelzer EHK, Covino R, Hummer G, Ernst R (2018) The molecular recognition of phosphatidic acid by an amphipathic helix in Opi1. *J Cell Biol* 217:3109-3126.
- Holevinsky KO, Nelson DJ (1998) Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys J* 75:2577-2586.
- Holthuis JCM, Levine TP (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:209-220.
- Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, Kanaho Y (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99:521-532.
- Horchani H, de Saint-Jean M, Barelli H, Antonny B (2014) Interaction of the Spo20 membrane-sensor motif with phosphatidic acid and other anionic lipids, and influence of the membrane environment. *PLoS One* 9:e113484.
- Houle MG, Kahn RA, Naccache PH, Bourgoin S (1995) ADP-ribosylation factor translocation correlates with potentiation of GTP γ S-stimulated phospholipase D activity in membrane fractions of HL-60 cells. *J Biol Chem* 270:22795-22800.
- Hu T, Exton JH (2003) Mechanisms of regulation of phospholipase D1 by protein kinase $C\alpha$. *J Biol Chem* 278:2348-2355.
- Hu T, Exton JH (2005) A point mutation at phenylalanine 663 abolishes protein kinase $C\alpha$'s ability to translocate to the perinuclear region and activate phospholipase D1. *Biochem Biophys Res Commun* 333:750-753.
- Huang C, Cabot MC (1990) Phorbol diesters stimulate the accumulation of phosphatidate, phosphatidylethanol, and diacylglycerol in three cell types. Evidence for the indirect formation of phosphatidylcholine-derived diacylglycerol by a phospholipase D pathway and direct formation of diacylglycerol by a phospholipase C pathway. *J Biol Chem* 265:14858-14863.
- Huang C, Wykle RL, Daniel LW, Cabot MC (1992) Identification of phosphatidylcholine-selective and phosphatidylinositol-selective phospholipases D in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 267:16859-16865.
- Huang P, Altshuller YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA (2005) Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell* 16:2614-2623.
- Huang R, Kucera GL, Rittenhouse SE (1991) Elevated cytosolic Ca^{2+} activates phospholipase D in human platelets. *J Biol Chem* 266:1652-1655.
- Hug H, Sarre TF (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291:329-343.
- Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, Frohman MA, Biden TJ (2004) Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 279:27534-27541.
- Hughes WE, Parker PJ (2001) Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *Biochem J* 356:727-736.
- Huijbregts RPH, Topalof L, Bankaitis VA (2000) Lipid metabolism and regulation of membrane trafficking. *Traffic* 1:195-202.
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont J-L, Du G, Frohman MA, Bader M-F, Poulain B (2001) A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15300-15305.
- Huston E, Gall I, Houslay TM, Houslay MD (2006) Helix-1 of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A1 regulates its phospholipase-D-dependent redistribution in response to release of Ca^{2+} . *J Cell Sci* 119:3799-3810.
- Huynh KK, Kay JG, Stow JL, Grinstein S (2007) Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology* 22:366-372.

I

- Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y (2006) Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes. *Biol Pharm Bull* 29:1542-1546.
- Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh H, Sakane F (2005) Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGK κ . *J Biol Chem* 280:39870-39881.
- Ioan-Facsinay A, de Kimpe SJ, Hellwig SMM, van Lent PL, Hofhuis FMA, van Ojik HH, Sedlik C, da Silveira SA, Gerber J, de Jong YF, Roozendaal R, Aarden LA, van den Berg WB, Saito T, Mosser D, Amigorena S, Izui S, van Ommen G-JB, van Vugt M, van de Winkel JGJ, Verbeek JS (2002) Fc γ RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 16:391-402.
- Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, Pisanu ME, Castellano G, Di Vito M, Venturini E, Glunde K, Bhujwala ZM, Mezzanzanica D, Canevari S, Podo F (2010) Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 70:2126-2135.
- Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y, Asano T, Oka Y (1998) Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 273:8741-8748.
- Ito Y, Nakashima S, Nozawa Y (1997) Hydrogen peroxide-induced phospholipase D activation in rat pheochromocytoma PC12 cells: possible involvement of Ca²⁺-dependent protein tyrosine kinase. *J Neurochem* 69:729-736.
- Iversen L, Mathiasen S, Larsen JB, Stamou D (2015) Membrane curvature bends the laws of physics and chemistry. *Nat Chem Biol* 11:822-825.
- Iwasaki Y, Nakano H, Yamane T (1994) Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:290-299.
- Iyer SS, Agrawal RS, Thompson CR, Thompson S, Barton JA, Kusner DJ (2006) Phospholipase D1 regulates phagocyte adhesion. *J Immunol* 176:3686-3696.
- Iyer SS, Kusner DJ (1999) Association of phospholipase D activity with the detergent-insoluble cytoskeleton of U937 promonocytic leukocytes. *J Biol Chem* 274:2350-2359.

J

- Jackson MB, Chapman ER (2008) The fusion pores of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 15:684-689.
- Jacobson K, Sheets ED, Simson R (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268:1441-1442.
- Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
- Jain A, Holthuis JCM (2017) Membrane contact sites, ancient and central hubs of cellular lipid logistics. *Biochim Biophys Acta* 1864:1450-1458.
- Jang J-H, Lee CS, Hwang D, Ryu SH (2012) Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res* 51:71-81.
- Janmey PA, Lindberg U (2004) Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:658-666.
- Janmey PA, Xian W, Flanagan LA (1999) Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing. *Chem Phys Lipids* 101:93-107.
- Jarquin-Pardo M, Fitzpatrick A, Galiano FJ, First EA, Davis JN (2007) Phosphatidic acid regulates the affinity of the murine phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase-I β for phosphatidylinositol-4-phosphate. *J Cell Biochem* 100:112-128.

Références bibliographiques

- Jaumouillé V, Farkash Y, Jaqaman K, Das R, Lowell CA, Grinstein S (2014) Actin cytoskeleton reorganization by the tyrosine kinase Syk regulates Fcy receptor responsiveness by increasing its lateral mobility and clustering. *Dev Cell* 29:534-546.
- Jaworski J (2007) ARF6 in the nervous system. *Eur J Cell Biol* 86:513-524.
- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by α - and β -synucleins. *Biochemistry* 37:4901-4909.
- Jenkins GH, Fiset PL, Anderson RA (1994) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 269:11547-11554.
- Jenkins GM, Frohman MA (2005) Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62:2305-2316.
- Jiang H, Alexandropoulos K, Song J, Foster DA (1994) Evidence that v-Src-induced phospholipase D activity is mediated by a G protein. *Mol Cell Biol* 14:3676-3682.
- Jiang Y, Sverdlov MS, Toth PT, Huang LS, Du G, Liu Y, Natarajan V, Minshall RD (2016) Phosphatidic acid produced by RalA-activated PLD2 Stimulates caveolae-mediated endocytosis and trafficking in endothelial cells. *J Biol Chem* 291:20729-20738.
- Johnson SA, Pleiman CM, Pao L, Schneringer J, Hippen K, Cambier JC (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* 155:4596-4603.
- Jones D, Morgan C, Cockcroft S (1999) Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. *Biochim Biophys Acta* 1439:229-244.
- Jones DR, Sanjuan MA, Mérida I (2000) Type I α phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is a putative target for increased intracellular phosphatidic acid. *FEBS Letters* 476:160-165.
- Jones MJ, Murray AW (1995) Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C- α translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D. *J Biol Chem* 270:5007-5713.
- Jose Lopez-Andreo M, Gomez-Fernandez JC, Corbalan-Garcia S (2003) The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase C ϵ to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell* 14:4885-4895.
- Jullien-Flores V, Mahé Y, Mirey G, Leprince C, Meunier-Bisceuil B, Sorkin A, Camonis JH (2000) RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *J Cell Sci* 113:2837-2844.

K

- Kahn RA, Gilman AG (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of G_s by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* 261:7906-7911.
- Kahn RA, Yucel JK, Malhotra V (1993) ARF signalling: a potential for phospholipase D in membrane traffic. *Cell* 75:1045-1048.
- Kaksonen M, Roux A (2018) Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:313-326.
- Kam Y, Exton JH (2001) Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 21:4055-4066.
- Kam Y, Exton JH (2004) Role of phospholipase D1 in the regulation of mTOR activity by lysophosphatidic acid. *FASEB J* 18:311-319.
- Kanaho Y, Funakoshi Y, Hasegawa H (2009) Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. *Biochim Biophys Acta* 1791:898-904.
- Kang DW, Min DS (2010) Platelet derived growth factor increases phospholipase D1 but not phospholipase D2 expression via NF κ B signaling pathway and enhances invasion of breast cancer cells. *Cancer Letters* 294:125-133.
- Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner K-P, Artarini A, Heuer D, Becker D, Khalil H, Ogilvie LA, Hess S, Mäurer AP, Müller E, Wolff T, Rudel T, Meyer TF (2010) Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463:818-822.

- Kasai T, Ohguchi K, Nakashima S, Ito Y, Naganawa T, Kondo N, Nozawa Y (1998) Increased activity of oleate-dependent type phospholipase D during actinomycin D-induced apoptosis in Jurkat T cells. *J Immunol* 161:6469-6474.
- Kassas N, Tanguy E, Thahouly T, Fouillen L, Heintz D, Chasserot-Golaz S, Bader M-F, Grant NJ, Vitale N (2017) Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J Biol Chem* 292:4266-4279.
- Kassas N, Tryoen-Tóth P, Corrotte M, Thahouly T, Bader M-F, Grant NJ, Vitale N (2012) Genetically encoded probes for phosphatidic acid. *Methods Cell Biol* 108:445-459.
- Katayama K, Kodaki T, Nagamachi Y, Yamashita S (1998) Cloning, differential regulation and tissue distribution of alternatively spliced isoforms of ADP-ribosylation-factor-dependent phospholipase D from rat liver. *Biochem J* 329:647-652.
- Kee Y, Yoo J-S, Hazuka CD, Peterson KE, Hsu S-C, Scheller RH (1997) Subunit structure of the mammalian excyst complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14438-14443.
- Kesler SR, Simensen RJ, Voeller K, Abidi F, Stevenson RE, Schwartz CE, Reiss AL (2007) Altered neurodevelopment associated with mutations of RSK2: a morphometric MRI study of Coffin-Lowry syndrome. *Neurogenetics* 8:143-147.
- Kessels GC, Roos D, Verhoeven AJ (1991) fMet-Leu-Phe-induced activation of phospholipase D in human neutrophils. Dependence on changes in cytosolic free Ca^{2+} concentration and relation with respiratory burst activation. *J Biol Chem* 266:23152-23156.
- Khan NA, Hichami A (1999) Ionotropic 5-hydroxytryptamine type 3 receptor activates the protein kinase C-dependent phospholipase D pathway in human T-cells. *Biochem J* 344:199-204.
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 18:4209-4220.
- Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, Bolen JB, Ledbetter JA (1993) Cross-linking of Fc γ receptor I (Fc γ RI) and receptor II (Fc γ RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem* 268:24442-24448.
- Kienzle C, von Blume J (2014) Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* 24:584-593.
- Kim JH, Han JM, Lee S, Kim Y, Lee TG, Park JB, Lee SD, Suh PG, Ryu SH (1999) Phospholipase D1 in caveolae: regulation by protein kinase C α and caveolin-1. *Biochemistry* 38:3763-3769.
- Kim JH, Lee S, Park JB, Lee SD, Kim JH, Ha SH, Hasumi K, Endo A, Suh P-G, Ryu SH (2003) Hydrogen peroxide induces association between glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phospholipase D2 to facilitate phospholipase D2 activation in PC12 cells. *J Neurochem* 85:1228-1236.
- Kim JH, Lee SD, Han JM, Lee TG, Kim Y, Park JB, Lambeth JD, Suh P-G, Ryu SH (1998) Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Letters* 430:231-235.
- Kim M, Moon C, Kim H, Shin MK, Min DS, Shin T (2010) Developmental levels of phospholipase D isozymes in the brain of developing rats. *Acta Histochem* 112:81-91.
- Kim Y, Han JM, Han BR, Lee K-A, Kim JH, Lee BD, Jang I-H, Suh P-G, Ryu SH (2000) Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane. *J Biol Chem* 275:13621-13627.
- Kishida S, Koyama S, Matsubara K, Kishida M, Matsuura Y, Kikuchi A (1997) Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* 15:2899-2907.
- Klein J (2005) Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J Neurochem* 94:1473-1487.
- Klopfenstein DR, Tomishige M, Stuurman N, Vale RD (2002) Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* 109:347-358.

Références bibliographiques

- Kobayashi N, Hozumi Y, Ito T, Hosoya T, Kondo H, Goto K (2007) Differential subcellular targeting and activity-dependent subcellular localization of diacylglycerol kinase isozymes in transfected cells. *Eur J Cell Biol* 86:433-444.
- Koch T, Brandenburg L-O, Schulz S, Liang Y, Klein J, Höllt V (2003) ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D2 activation is required for agonist-induced mu-opioid receptor endocytosis. *J Biol Chem* 278:9979-9985.
- Kocsis MG, Weselake RJ (1996) Phosphatidate phosphatases of mammals, yeast, and higher plants. *Lipids* 31:785-802.
- Kodaki T, Yamashita S (1997) Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J Biol Chem* 272:11408-11413.
- Kooijman EE, Burger KNJ (2009) Biophysics and function of phosphatidic acid: a molecular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1791:881-888.
- Kooijman EE, Carter KM, van Laar EG, Chupin V, Burger KNJ, de Kruijff B (2005) What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry* 44:17007-17015.
- Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KNJ (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* 4:162-174.
- Kook S, Exton JH (2005) Identification of interaction sites of protein kinase C α on phospholipase D1. *Cell Signal* 17:1423-1432.
- Korn ED, Carlier M-F, Pantaloni D (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238:638-644.
- Kötter K, Jin S, Klein J (2000) Inhibition of astroglial cell proliferation by alcohols: interference with the protein kinase C-phospholipase D signaling pathway. *Int J Dev Neuroscience* 18:825-831.
- Kozlov MM, Chernomordik LV (2015) Membrane tension and membrane fusion. *Curr Opin Struct Biol* 33:61-67.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 15:1942-1952.
- Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 11:1709-1726.
- Ktistakis NT, Brown HA, Sternweis PC, Roth MG (1995) Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4952-4956.
- Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG (1996) Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol* 134:295-306.
- Ktistakis NT, Delon C, Manifava M, Wood E, Ganley I, Sugars JM (2003) Phospholipase D1 and potential targets of its hydrolysis product, phosphatidic acid. *Biochem Soc Trans* 31:94-97.
- Kuribara H, Tago K, Yokozeki T, Sasaki T, Takai Y, Morii N, Narumiya S, Katada T, Kanaho Y (1995) Synergistic activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factor and rhoA p21, and its inhibition by Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J Biol Chem* 270:25667-25671.
- Kusner DJ, Hall CF, Jackson S (1999) Fc gamma receptor-mediated activation of phospholipase D regulates macrophage phagocytosis of IgG-opsonized particles. *J Immunol* 162:2266-2274.
- Kusumi A, Sako Y (1996) Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 8:566-574.
- Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M (1993) Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* 65:2021-2040.
- Kwak J-Y, Lopez I, Uhlinger DJ, Ryu SH, Lambeth JD (1995) RhoA and a cytosolic 50-kDa factor reconstitute GTP γ S-dependent phospholipase D activity in human neutrophil subcellular fractions. *J Biol Chem* 270:27093-27098.

L

- Lam AD, Tryoen-Tóth P, Tsai B, Vitale N, Stuenkel EL (2008) SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol Biol Cell* 19:485-497.
- Lambeth JD, Kwak J-Y, Bowman EP, Perry D, Uhlinger DJ, Lopez I (1995) ADP-ribosylation factor functions synergistically with a 50-kDa cytosolic factor in cell-free activation of human neutrophil phospholipase D. *J Biol Chem* 270:2431-2434.
- Lapenna A, De Palma M, Lewis CE (2018) Perivascular macrophages in health and disease. *Nat Rev Immunol* 18:689-702.
- Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering DJ, Mazurkiewicz JE, Lennartz MR (2000) Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol* 165:2809-2817.
- Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E (2008) The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* 7:1013-1019.
- Lee C, Kang H-S, Chung J-K, Sekiya F, Kim J-R, Han J-S, Kim SR, Bae YS, Morris AJ, Rhee SG (1997b) Inhibition of phospholipase D by clathrin assembly protein 3 (AP3). *J Biol Chem* 272:15986-15992.
- Lee C, Kim SR, Chung J-K, Frohman MA, Kilimann MW, Rhee SG (2000b) Inhibition of phospholipase D by amphiphysins. *J Biol Chem* 275:18751-18758.
- Lee CS, Kim IS, Park JB, Lee MN, Lee HY, Suh P-G, Ryu SH (2006) The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol* 8:477-484.
- Lee HY, Park JB, Jang IH, Chae YC, Kim JH, Kim IS, Suh P-G, Ryu SH (2004) Munc-18-1 inhibits phospholipase D activity by direct interaction in an epidermal growth factor-reversible manner. *J Biol Chem* 279:16339-16348.
- Lee JS, Kim JH, Jang IH, Kim HS, Han JM, Kazlauskas A, Yagisawa H, Suh P-G, Ryu SH (2005) Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate specifically interacts with the phox homology domain of phospholipase D1 and stimulates its activity. *J Cell Sci* 118:4405-4413.
- Lee M-Y, Jo Y-H, Chun M-H, Chung J-W, Kim M-S, Min D (2000a) Immunohistochemical localization of phospholipase D1 in rat central nervous system. *Brain Res* 864:52-59.
- Lee S, Park JB, Kim JH, Kim Y, Kim JH, Shin K-J, Lee JS, Ha SH, Suh P-G, Ryu SH (2001) Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J Biol Chem* 276:28252-28260.
- Lee TG, Park JB, Lee SD, Hong S, Kim JH, Kim Y, Yi KS, Bae S, Hannun YA, Obeid LM, Suh P-G, Ryu SH (1997a) Phorbol myristate acetate-dependent association of protein kinase C alpha with phospholipase D1 in intact cells. *Biochim Biophys Acta* 1347:199-204.
- Leiros I, Secundo F, Zambonelli C, Servi S, Hough E (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* 8:655-667.
- Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:99-111.
- Li D, Xiong J, Qu A, Xu T (2004) Three-dimensional tracking of single secretory granules in live PC12 cells. *Biophys J* 87:1991-2001.
- Liang JO, Sung T-C, Morris AJ, Frohman MA, Kornfeld S (1997) Different domains of mammalian ADP-ribosylation factor 1 mediate interaction with selected target proteins. *J Biol Chem* 272:33001-33008.
- Lin J, Kurilova S, Scott BL, Bosworth E, Iverson BE, Bailey EM, Hoppe AD (2016) TIRF imaging of Fc gamma receptor microclusters dynamics and signaling on macrophages during frustrated phagocytosis. *BMC Immunol* 17:5.
- Liscovitch M, Chalifa V, Danin M, Eli Y (1991) Inhibition of neural phospholipase D activity by aminoglycoside antibiotics. *Biochem J* 279:319-321.
- Liscovitch M, Chalifa V, Pertile P, Chen C-S, Cantley LC (1994) Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J Biol Chem* 269:21403-21406.
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X (2000) Phospholipase D : molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* 345:401-415.

Références bibliographiques

- Liu M-Y, Gutowski S, Sternweis PC (2001) The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity. *J Biol Chem* 276:5556-5562.
- Liu Y, Zhang Y-W, Wang X, Zhang H, You X, Liao F-F, Xu H (2009) Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1. *J Biol Chem* 284:12145-12152.
- Loewen CJR, Gaspar ML, Jesch SA, Delon C, Ktistakis NT, Henry SA, Levine TP (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* 304:1644-1647.
- Long C, Odavić R, Sargent EJ (1967) The action of cabbage-leaf phospholipase D upon lysolecithin. *Biochem J* 102:216-220.
- Loovers HM, Kortholt A, de Groote H, Whitty L, Nussbaum RL, van Haastert PJM (2007) Regulation of phagocytosis in Dictyostelium by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4. *Traffic* 8:618-628.
- Lopez CI, Pelletan LE, Suhaiman L, De Blas GA, Vitale N, Mayorga LS, Belmonte SA (2012) Diacylglycerol stimulates acrosomal exocytosis by feeding into a PKC- and PLD1-dependent positive loop that continuously supplies phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochim Biophys Acta* 1821:1186-1199.
- Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD (1998) Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem* 273:12846-12852.
- Lopez I, Burns DJ, Lambeth JD (1995) Regulation of phospholipase D by protein kinase C in human neutrophils. Conventional isoforms of protein kinase C phosphorylate a phospholipase D-related component in the plasma membrane. *J Biol Chem* 270:19465-19472.
- Lucocq J, Manifava M, Bi K, Roth MG, Ktistakis NT (2001) Immunolocalisation of phospholipase D1 on tubular vesicular membranes of endocytic and secretory origin. *Eur J Cell Biol* 80:508-520.
- Lukowski S, Lecomte M-C, Mira J-P, Marin P, Gautero H, Russo-Marie F, Geny B (1996) Inhibition of phospholipase D activity by fodrin. An active role for the cytoskeleton. *J Biol Chem* 271:24164-24171.
- Lukowski S, Mira J-P, Zachowski A, Geny B (1998) Fodrin inhibits phospholipases A2, C, and D by decreasing polyphosphoinositide cell content. *Biochem Biophys Res Commun* 248:278-284.
- Luo J-Q, Liu X, Hammond SM, Colley WC, Feig LA, Frohman MA, Morris AJ, Foster DA (1997) RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP2-dependent phospholipase D1. *Biochem Biophys Res Commun* 235:854-859.

M

- M'Rabet L, Coffey PJ, Wolthuis RMF, Zwartkruis F, Koenderman L, Bos JL (1999) Differential fMet-Leu-Phe- and platelet-activating factor-induced signaling toward Ral activation in primary human neutrophils. *J Biol Chem* 274:21847-21852.
- Ma W, Park S-Y, Han J-S (2010) Role of phospholipase D1 in glucose-induced insulin secretion in pancreatic β cells. *Exp Mol Med* 42:456-464.
- Madaule P, Furuyashiki T, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Morii N, Narumiya S (1995) A novel partner for the GTP-bound forms of *rho* and *rac*. *FEBS Letters* 377:243-248.
- Madesh M, Balasubramanian KA (1997) Metal ion stimulation of phospholipase D-like activity of isolated rat intestinal mitochondria. *Lipids* 32:471-479.
- Majeed M, Cavegion E, Lowell CA, Berton G (2001) Role of Src kinases and Syk in Fc γ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J Leukoc Biol* 70:801-811.
- Malcolm KC, Elliott CM, Exton JH (1996) Evidence for Rho-mediated agonist stimulation of phospholipase D in rat1 fibroblasts. Effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J Biol Chem* 271:13135-13139.
- Malcolm KC, Ross AH, Qiu R-G, Symons M, Exton JH (1994) Activation of rat liver phospholipase D by the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 269:25951-25954.
- Mallat M, Marín-Teva JL, Chéret C (2005) Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15:101-107.

- Manifava M, Thuring JWJF, Lim Z-Y, Packman L, Holmes AB, Ktistakis NT (2001) Differential binding of traffic-related proteins to phosphatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate-coupled affinity reagents. *J Biol Chem* 276:8987-8994.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
- Mansour SJ, Skaug J, Zhao X-H, Giordano J, Scherer SW, Melançon P (1999) p200 ARF-GEP1: A Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7968-7973.
- Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS (2013) Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14:135-152.
- Margiotta A, Bucci C (2016) Role of intermediate filaments in vesicular traffic. *Cells* 5.
- Marie-Anaïs F, Mazzolini J, Herit F, Niedergang F (2016) Dynamin-actin cross talk contributes to phagosome formation and closure. *Traffic* 17:487-499.
- Marion S, Mazzolini J, Herit F, Bourdoncle P, Kambou-Pene N, Hailfinger S, Sachse M, Ruland J, Benmerah A, Echard A, Thome M, Niedergang F (2012) The NF- κ B signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles. *Dev Cell* 23:954-967.
- Mark BL, Jilkina O, Bhullar RP (1996) Association of Ral GTP-binding protein with human platelet dense granules. *Biochem Biophys Res Commun* 225:40-46.
- Marshall JG, Booth JW, Stambolic V, Mak T, Balla T, Schreiber AD, Meyer T, Grinstein S (2001) Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* 153:1369-1380.
- Martelli AM, Bortul R, Bareggi R, Tabellini G, Grill V, Baldini G, Narducci P (1999) The pro-apoptotic drug camptothecin stimulates phospholipase D activity and diacylglycerol production in the nucleus of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res* 59:3961-3967.
- Martin A, Brown FD, Hodgkin MN, Bradwell AJ, Cook SJ, Hart M, Wakelam MJO (1996) Activation of phospholipase D and phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in HL60 membranes is mediated by endogenous Arf but not Rho. *J Biol Chem* 271:17397-17403.
- Martin SF, DeBlanc RL, Hergenrother PJ (2000) Determination of the substrate specificity of the phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* via an inorganic phosphate quantitation assay. *Anal Biochem* 278:106-110.
- Martin TFJ (2001) PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 13:493-499.
- Martin TW (1988) Formation of diacylglycerol by a phospholipase D-phosphatidate phosphatase pathway specific for phosphatidylcholine in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 962:282-296.
- Massenburg D, Han J-S, Liyanage M, Patton WA, Rhee SG, Moss J, Vaughan M (1994) Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11718-11722.
- Masters TA, Pontes B, Viasnoff V, Li Y, Gauthier NC (2013) Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:11875-11880.
- Matsubara K, Kishida S, Matsuura Y, Kitayama H, Noda M, Kikuchi A (1999) Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* 18:1303-1312.
- Matsubara T, Shirai Y, Miyasaka K, Murakami T, Yamaguchi Y, Ueyama T, Kai M, Sakane F, Kanoh H, Hashimoto T, Kamada S, Kikkawa U, Saito N (2006) Nuclear transportation of diacylglycerol kinase γ and its possible function in the nucleus. *J Biol Chem* 281:6152-6164.
- Maucort G, Kasula R, Papadopulos A, Nieminen TA, Rubinsztein-Dunlop H, Meunier FA (2014) Mapping organelle motion reveals a vesicular conveyor belt spatially replenishing secretory vesicles in stimulated chromaffin cells. *PLoS One* 9:e87242.
- Mayor S, Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:603-612.
- McDermott M, Wakelam MJO, Morris AJ (2004) Phospholipase D. *Biochem Cell Biol* 82:225-253.
- McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438:590-596.

Références bibliographiques

- McMahon HT, Kozlov MM, Martens S (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell* 140:601-605.
- Meacci E, Donati C, Cencetti F, Romiti E, Farnararo M, Bruni P (2000) Receptor-activated phospholipase D is present in caveolin-3-enriched light membranes of C2C12 myotubes. *FEBS Letters* 473:10-14.
- Mebarek S, Komati H, Naro F, Zeiller C, Alvisi M, Lagarde M, Prigent A-F, Némoz G (2007) Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. *J Cell Sci* 120:407-416.
- Meier KE, Gibbs TC, Knoepp SM, Ella KM (1999) Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439:199-213.
- Melendez AJ, Harnett MM, Allen JM (2001) Crosstalk between ARF6 and protein kinase C α in Fc γ RI-mediated activation of phospholipase D1. *Curr Biol* 11:869-874.
- Menon D, Salloum D, Bernfeld E, Gorodetsky E, Akselrod A, Frias MA, Sudderth J, Chen P-H, DeBerardinis R, Foster DA (2017) Lipid sensing by mTOR complexes via de novo synthesis of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 292:6303-6311.
- Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W (2002) Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* 4:691-698.
- Metz SA, Dunlop M (1990) Stimulation of insulin release by phospholipase D. A potential role for endogenous phosphatidic acid in pancreatic islet function. *Biochem J* 270:427-435.
- Millar CA, Jess TJ, Saqib KM, Wakelam MJO, Gould GW (1999) 3T3-L1 adipocytes express two isoforms of phospholipase D in distinct subcellular compartments. *Biochem Biophys Res Commun* 254:734-738.
- Mima J, Wickner W (2009) Complex lipid requirements for SNARE- and SNARE chaperone-dependent membrane fusion. *J Biol Chem* 284:27114-27122.
- Min DS, Exton JH (1998) Phospholipase D Is associated in a phorbol ester- dependent manner with protein kinase C- α and with a 220-kDa protein which is phosphorylated on serine and threonine. *Biochem Biophys Res Commun* 248:533-537.
- Min DS, Kim E-G, Exton JH (1998) Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H₂O₂ in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 273:29986-29994.
- Mineo C, Anderson RGW, White MA (1997) Physical association with Ras enhances activation of membrane-bound Raf (RafCAAX). *J Biol Chem* 272:10345-10348.
- Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y (1986) Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261:11398-11403.
- Mitchell R, McCulloch D, Lutz E, Johnson M, MacKenzie C, Fennell M, Fink G, Zhou W, Sealson SC (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* 392:411-414.
- Monovich L, Mugrage B, Quadros E, Toscano K, Tommasi R, LaVoie S, Liu E, Du Z, LaSala D, Boyar W, Steed P (2007) Optimization of halopemide for phospholipase D2 inhibition. *Bioorg Med Chem Letters* 17:2310-2311.
- Montuenga LM, Guembe L, Burrell MA, Bodegas ME, Calvo A, Sola JJ, Sesma P, Villaro AC (2003) The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. *Progr Histochem Cytochem* 38:153-272.
- Moolenaar WH (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* 270:12949-12952.
- Moretti J, Blander JM (2014) Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. *Curr Opin Immunol* 26:100-110.
- Morgan CP, Sengelov H, Whatmore J, Borregaard N, Cockcroft S (1997) ADP-ribosylation-factor-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles and mobilizes to the plasma membrane following N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils. *Biochem J* 325:581-585.
- Moritz A, De Graan PNE, Gispen WH, Wirtz KWA (1992) Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J Biol Chem* 267:7207-7210.

- Morris AJ, Frohman MA, Engebrecht J (1997) Measurement of phospholipase D activity. *Anal Biochem* 252:1-9.
- Moskalenko S, Henry DO, Rosse C, Mirey G, Camonis JH, White MA (2002) The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 4:66-72.
- Moss J, Vaughan M (1998) Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* 273:21431-21434.
- Mukhopadhyay S, Frias MA, Chatterjee A, Yellen P, Foster DA (2016) The enigma of rapamycin dosage. *Mol Cancer Ther* 15:347-353.

N

- Nakamura T, Suchard SJ, Abe A, Shayman JA, Boxer LA (1994) Role of diradylglycerol formation in H₂O₂ and lactoferrin release in adherent human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 56:105-109.
- Nakamura Y, Fukami K (2017) Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *J Biochem* 161:315-321.
- Nakanishi H, de los Santos P, Neiman AM (2004) Positive and negative regulation of a SNARE protein by control of intracellular localization. *Mol Biol Cell* 15:1802-1815.
- Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M, Kishida M, Okawa K, Iwamatsu A, Kishida S, Kikuchi A (1999) Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J* 18:3629-3642.
- Nakashima S, Nozawa Y (1999) Possible role of phospholipase D in cellular differentiation and apoptosis. *Chem Phys Lipids* 98:153-164.
- Natarajan V, Scribner WM, Vepa S (1996) Regulation of phospholipase D by tyrosine kinases. *Chem Phys Lipids* 80:103-116.
- Neher E (2018) Neurosecretion: what can we learn from chromaffin cells. *Pflugers Arch* 470:7-11.
- Nelson RK, Frohman MA (2015) Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *J Lipid Res* 56:2229-2237.
- Ngsee JK, Elferink LA, Scheller RH (1991) A family of ras-like GTP-binding proteins expressed in electromotor neurons. *J Biol Chem* 266:2675-2680.
- Nicolson GL (2014) The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta* 1838:1451-1466.
- Niedergang F, Colucci-Guyon E, Dubois T, Raposo G, Chavrier P (2003) ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* 161:1143-1150.
- Niedergang F, Grinstein S (2018) How to build a phagosome: new concepts for an old process. *Curr Opin Cell Biol* 50:57-63.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8:34-47.
- Nishikimi A, Fukuhara H, Su W, Hongu T, Takasuga S, Mihara H, Cao Q, Sanematsu F, Kanai M, Hasegawa H, Tanaka Y, Shibasaki M, Kanaho Y, Sasaki T, Frohman MA, Fukui Y (2009) Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* 324:384-387.
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.

O

- O'Lunaigh N, Pardo R, Fensome A, Allen-Baume V, Jones D, Holt MR, Cockcroft S (2002) Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells. *Mol Biol Cell* 13:3730-3746.

Références bibliographiques

- O'Reilly MC, Oguin TH 3rd, Scott SA, Thomas PG, Locuson CW, Morrison RD, Daniels JS, Brown HA, Lindsley CW (2014) Discovery of a highly selective PLD2 inhibitor (ML395): a new probe with improved physicochemical properties and broad-spectrum antiviral activity against influenza strains. *ChemMedChem* 9:2633-2637.
- Oguin TH 3rd, Sharma S, Stuart AD, Duan S, Scott SA, Jones CK, Daniels JS, Lindsley CW, Thomas PG, Brown HA (2014) Phospholipase D facilitates efficient entry of influenza virus, allowing escape from innate immune inhibition. *J Biol Chem* 289:25405-25417.
- Ohguchi K, Banno Y, Nakashima S, Nozawa Y (1996) Regulation of membrane-bound phospholipase D by protein kinase C in HL60 cells. Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 271:4366-4372.
- Ohguchi K, Nakashima S, Tan Z, Banno Y, Dohi S, Nozawa Y (1997) Increased activity of small gtp-binding protein-dependent phospholipase D during differentiation in human promyelocytic leukemic HL60 cells. *J Biol Chem* 272:1990-1996.
- Oikawa T, Yamaguchi H, Itoh T, Kato M, Ijuin T, Yamazaki D, Suetsugu S, Takenawa T (2004) PtdIns(3,4,5)P₃ binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol* 6:420-426.
- Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S *et al.* (2012) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* 44:511-516.
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-5422.
- 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* 279:5298-5305.
- Okamura S, Yamashita S (1994) Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from pig lung. *J Biol Chem* 269:31207-31213.
- Oliveira TG, Di Paolo G (2010) Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801:799-805.
- Olson SC, Bowman EP, Lambeth JD (1991) Phospholipase D activation in a cell-free system from human neutrophils by phorbol 12-myristate 13-acetate and guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). Activation is calcium dependent and requires protein factors in both the plasma membrane and cytosol. *J Biol Chem* 266:17236-17242.
- Ory S, Ceridono M, Momboisse F, Houy S, Chasserot-Golaz S, Heintz D, Calco V, Haeberle A-M, Espinoza FA, Sims PJ, Bailly Y, Bader M-F, Gasman S (2013) Phospholipid scramblase-1-induced lipid reorganization regulates compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *J Neurosci* 33:3545-3556.
- Osisami M, Ali W, Frohman MA (2012) A role for phospholipase D3 in myotube formation. *PLoS One* 7:e33341.
- Otani Y, Yamaguchi Y, Sato Y, Furuichi T, Ikenaka K, Kitani H, Baba H (2011) PLD4 is involved in phagocytosis of microglia: expression and localization changes of PLD4 are correlated with activation state of microglia. *PLoS One* 6:e27544.
- Oude Weernink PA, López de Jesús M, Schmidt M (2007) Phospholipase D signaling: orchestration by PIP₂ and small GTPases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374:399-411.

P

- Pachter JA, Pai J-K, Mayer-Ezell R, Petrin JM, Dobek E, Bishop WR (1992) Differential regulation of phosphoinositide and phosphatidylcholine hydrolysis by protein kinase C-β1 overexpression. Effects on stimulation by α-thrombin, guanosine 5'-O-(thiotriphosphate), and calcium. *J Biol Chem* 267:9826-9830.
- Pai J-K, Dobek EA, Bishop WR (1991) Endothelin-1 activates phospholipase D and thymidine incorporation in fibroblasts overexpressing protein kinase C_{β1}. *Cell Regul* 2:897-903.

- Pai J-K, Siegel MI, Egan RW, Billah MM (1998) Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. *J Biol Chem* 263:12472-12477.
- Paris S, Béraud-Dufour S, Robineau S, Bigay J, Antonny B, Chabre M, Chardin P (1997) Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J Biol Chem* 272:22221-22226.
- Park JB, Kim JH, Kim Y, Ha SH, Yoo J-S, Du G, Frohman MA, Suh P-G, Ryu SH (2000) Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by α -actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. *J Biol Chem* 275:21295-21301.
- Park MH, Ahn B-H, Hong Y-K, Min DS (2009) Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF- κ B/Sp1-mediated signaling pathways. *Carcinogenesis* 30:356-365.
- Park S-K, Provost JJ, Bae CD, Ho W-T, Exton JH (1997) Cloning and characterization of phospholipase D from rat brain. *J Biol Chem* 272:29263-29271.
- Payton JE, Perrin RJ, Woods WS, George JM (2004) Structural determinants of PLD2 inhibition by α -synuclein. *J Mol Biol* 337:1001-1009.
- Pédruzzi E, Hakim J, Giroud J-P, Périanin A (1998) Analysis of choline and phosphorylcholine content in human neutrophils stimulated by f-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate: contribution of phospholipase D and C. *Cell Signal* 10:481-489.
- Pelletán LE, Suhaiman L, Vaquer CC, Bustos MA, De Blas GA, Vitale N, Mayorga LS, Belmonte SA (2015) ADP ribosylation factor 6 (ARF6) promotes acrosomal exocytosis by modulating lipid turnover and Rab3A activation. *J Biol Chem* 290:9823-9841.
- Penalzoza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z (2006) Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol* 126:149-158.
- Peng H-J, Henkels KM, Mahankali M, Dinauer MC, Gomez-Cambronero J (2011) Evidence for two CRIB domains in phospholipase D2 (PLD2) that the enzyme uses to specifically bind to the small GTPase Rac2. *J Biol Chem* 286:16308-16320.
- Pereira PM, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A (2010) Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet* 18:627-633.
- Perez-Mansilla B, Ha VL, Justin N, Wilkins AJ, Carpenter CL, Thomas GMH (2006) The differential regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases and phospholipase D1 by ADP-ribosylation factors 1 and 6. *Biochim Biophys Acta* 1761:1429-1442.
- Perry DK, Hannun YA (1998) The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1436:233-243.
- Pertile P, Liscovitch M, Chalifa V, Cantley LC (1995) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis is required for activation of phospholipase D in U937 cells. *J Biol Chem* 270:5130-5135.
- Pettitt TR, Martin A, Horton T, Liossis C, Lord JM, Wakelam MJO (1997) Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272:17354-17359.
- Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker J, Cherfils J, Jackson CL (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 3:275-285.
- Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44:655-667.
- Piomelli D, Astarita G, Rapaka R (2007) A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci* 8:743-754.
- Pleskot R, Pejchar P, Staiger CJ, Potocký M (2014) When fat is not bad: the regulation of actin dynamics by phospholipid signaling molecules. *Front Plant Sci* 5:5.
- Pollard TD (2016) Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a018226.
- Polzin A, Shipitsin M, Goi T, Feig LA, Turner TJ (2002) Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Mol Cell Biol* 22:1714-1722.
- Pomorski T, Menon AK (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* 63:2908-2921.

Références bibliographiques

- Potocký M, Pleskot R, Pejchar P, Vitale N, Kost B, Žárský V (2014) Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. *New Phytol* 203:483-494.
- Powner DJ, Hodgkin MN, Wakelam MJO (2002) Antigen-stimulated activation of phospholipase D1b by Rac1, ARF6, and PKC α in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell* 13:1252-1262.
- Prabhudas M, Bowdish D, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, Krieger M, Loike J, Means TK, Moestrup SK, Post S, Sawamura T, Silverstein S, Wang X-Y, El Khoury J (2014) Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J Immunol* 192:1997-2006.
- Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJM, Lippincott-Schwartz J (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389:81-85.
- Provost JJ, Fudge J, Israelit S, Siddiqi AR, Exton JH (1996) Tissue-specific distribution and subcellular distribution of phospholipase D in rat: evidence for distinct RhoA- and ADP-ribosylation factor (ARF)-regulated isoenzymes. *Biochem J* 319:285-291.

R

- Raben DM, Barber CN (2017) Phosphatidic acid and neurotransmission. *Adv Biol Regul* 63:15-21.
- Radhakrishna H, Donaldson JG (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* 139:49-61.
- Rahier R, Noiriél A, Abousalham A (2016) Development of a direct and continuous phospholipase D assay based on the chelation-enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline. *Anal Chem* 88:666-674.
- Randall RW, Bonser RW, Thompson NT, Garland LG (1990) A novel and sensitive assay for phospholipase D in intact cells. *FEBS Letters* 264:87-90.
- Rankovic M, Jacob L, Rankovic V, Brandenburg L-O, Schröder H, Höllt V, Koch T (2009) ADP-ribosylation factor 6 regulates mu-opioid receptor trafficking and signaling via activation of phospholipase D2. *Cell Signal* 21:1784-1793.
- Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotillin in the Rho-binding domain. *J Biol Chem* 271:13556-13560.
- Reinhold SL, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM (1990) Activation of human neutrophil phospholipase D by three separable mechanisms. *FASEB J* 4:208-214.
- Ren X-D, Bokoch GM, Traynor-Kaplan A, Jenkins GH, Anderson RA, Schwartz MA (1996) Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol Biol Cell* 7:435-442.
- Rettig J, Neher E (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Science* 298:781-785.
- Ribbes G, Henry J, Cariven C, Pontarotti P, Chap H, Record M (1996) Expressed Sequence Tags Identify Human Isolates of the ARF-Dependent Phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun* 224:206-211.
- Ridley AJ (1999) Stress fibres take shape. *Nat Cell Biol* 1:E64-E66.
- Ridley AJ (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 16:522-529.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410.
- Rizzo MA, Romero G (2002) Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol Ther* 94:35-50.
- Rizzo MA, Shome K, Vasudevan C, Stolz DB, Sung T-C, Frohman MA, Watkins SC, Romero G (1999) Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent Raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274:1131-1139.

- Rizzo MA, Shome K, Watkins SC, Romero G (2000) The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 275:23911-23918.
- Roach AN, Wang Z, Wu P, Zhang F, Chan RB, Yonekubo Y, Di Paolo G, Gorfe AA, Du G (2012) Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization. *J Lipid Res* 53:2598-2609.
- Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA (2013) Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:713-726.
- Robinson MS, Kreis TE (1992) Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: effects of brefeldin A and G protein activators. *Cell* 69:129-138.
- Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, Janssen L, Houben D, Janssen H, Zwart W, Neefjes J (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150^{Glued} and late endosome positioning. *J Cell Biol* 185:1209-1225.
- Rogasevskaja TP, Coorsen JR (2015) The role of phospholipase D in regulated exocytosis. *J Biol Chem* 290:28683-28696.
- Roth MG (2008) Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* 9:1233-1239.
- Roth MG, Bi K, Ktistakis NT, Yu S (1999) Phospholipase D as an effector for ADP-ribosylation factor in the regulation of vesicular traffic. *Chem Phys Lipids* 98:141-152.
- Rudge SA, Wakelam MJO (2009) Inter-regulatory dynamics of phospholipase D and the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1791:856-861.
- Rümenapp U, Geiszt M, Wahn F, Schmidt M, Jakobs KH (1995) Evidence for ADP-ribosylation-factor-mediated activation of phospholipase D by m3 muscarinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 234:240-244.

S

- Saito M, Iwadate M, Higashimoto M, Ono K, Takebayashi Y, Takenoshita S (2007) Expression of phospholipase D2 in human colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 18:1329-1334.
- Saito M, Kanfer J (1973) Solubilization and properties of a membrane-bound enzyme from rat brain catalyzing a base-exchange reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 53:391-398.
- Saito M, Kanfer J (1975) Phosphatidohydrolase activity in a solubilized preparation from rat brain particulate fraction. *Arch Biochem Biophys* 169:318-323.
- Saito S, Goto K, Tonosaki A, Kondo H (1997) Gene cloning and characterization of CDP-diacylglycerol synthase from rat brain. *J Biol Chem* 272:9503-9509.
- Sakisaka T, Itoh T, Miura K, Takenawa T (1997) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol* 17:3841-3849.
- Sanjuán MA, Pradet-Balade B, Jones DR, Martínez-A C, Stone JC, Garcia-Sanz JA, Mérida I (2003) T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase α to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation. *J Immunol* 170:2877-2883.
- Santos T, Carrasco S, Jones DR, Mérida I, Eguinoa A (2002) Dynamics of diacylglycerol kinase ζ translocation in living T-cells. Study of the structural domain requirements for translocation and activity. *J Biol Chem* 277:30300-30309.
- Santy LC, Frank SR, Hatfield JC, Casanova JE (1999) Regulation of ARNO nucleotide exchange by a PH domain electrostatic switch. *Curr Biol* 9:1173-1176.
- Scallan BJ, Fung W-JC, Tsang TC, Li S, Kado-Fong H, Huang K-S, Kochan JP (1991) Primary structure and functional activity of a phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D. *Science* 252:446-448.
- Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Söling H-D (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401:133-141.
- Schmidt JA, Brown WJ (2009) Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 regulates Golgi complex structure and function. *J Cell Biol* 186:211-218.

Références bibliographiques

- Schmidt M, Fasselt B, Rümennapp U, Bienek C, Wieland T, van Koppen CJ, Jakobs KH (1995) Rapid and persistent desensitization of m3 muscarinic acetylcholine receptor-stimulated phospholipase D. Concomitant sensitization of phospholipase C. *J Biol Chem* 270:19949-19956.
- Schmoranzler J, Simon SM (2003) Role of microtubules in fusion of post-Golgi vesicles to the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 14:1558-1569.
- Schwarz K, Natarajan S, Kassas N, Vitale N, Schmitz F (2011) The synaptic ribbon is a site of phosphatidic acid generation in ribbon synapses. *J Neurosci* 31:15996-16011.
- Sciorra VA, Rudge SA, Prestwich GD, Frohman MA, Engebrecht J, Morris AJ (1999) Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *EMBO J* 18:5911-5921.
- Sciorra VA, Rudge SA, Wang J, McLaughlin S, Engebrecht J, Morris AJ (2002) Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes. *J Cell Biol* 159:1039-1049.
- Scott CC, Dobson W, Botelho RJ, Coady-Osberg N, Chavrier P, Knecht DA, Heath C, Stahl P, Grinstein S (2005) Phosphatidylinositol-4,5- bis phosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol* 169:139-149.
- Scott SA, Selvy PE, Buck JR, Cho HP, Criswell TL, Thomas AL, Armstrong MD, Arteaga CL, Lindsley CW, Brown HA (2009) Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat Chem Biol* 5:108-117.
- Seet LF, Hong W (2006) The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1761:878-896.
- Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111:6064-6119.
- Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:361-374.
- Shen Y, Xu L, Foster DA (2001) Role for phospholipase D in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* 21:595-602.
- Shibasaki Y, Ishihara H, Kizuki N, Asano T, Oka Y, Yazaki Y (1997) Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J Biol Chem* 272:7578-7581.
- Shirai Y, Kouzuki T, Kakefuda K, Moriguchi S, Oyagi A, Horie K, Morita SY, Shimazawa M, Fukunaga K, Takeda J, Saito N, Hara H (2010) Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGK β in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS One* 5:e11602.
- Shome K, Nie Y, Romero G (1998) ADP-ribosylation factor proteins mediate agonist-induced activation of phospholipase D. *J Biol Chem* 273:30836-30841.
- Shome K, Rizzo MA, Vasudevan C, Andresen B, Romero G (2000) The activation of phospholipase D by endothelin-1, angiotensin II, and platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle A10 cells is mediated by small G proteins of the ADP-ribosylation factor family. *Endocrinology* 141:2200-2208.
- Short B, Preisinger C, Schaletzky J, Kopajtich R, Barr FA (2002) The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr Biol* 12:1792-1795.
- Shulga YV, Myers DS, Ivanova PT, Milne SB, Brown HA, Topham MK, Epanand RM (2010) Molecular species of phosphatidylinositol-cycle intermediates in the endoplasmic reticulum and plasma membrane. *Biochemistry* 49:312-317.
- Shulga YV, Topham MK, Epanand RM (2011) Regulation and functions of diacylglycerol kinases. *Chem Rev* 111:6186-6208.
- Siddhanta A, Shields D (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* 273:17995-17998.
- Siddiqi AR, Smith JL, Ross AH, Qiu R-G, Symons M, Exton JH (1995) Regulation of phospholipase D in HL60 cells. Evidence for a cytosolic phospholipase D. *J Biol Chem* 270:8466-8473.
- Siddiqi AR, Srajer GE, Leslie CC (2000) Regulation of human PLD1 and PLD2 by calcium and protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1497:103-114.

- Siddiqui RA, English D (1997) Phosphatidic acid elicits calcium mobilization and actin polymerization through a tyrosine kinase-dependent process in human neutrophils: a mechanism for induction of chemotaxis. *Biochim Biophys Acta* 1349:81-95.
- Signorelli P, Luberto C, Hannun YA (2001) Ceramide inhibition of NF- κ B activation involves reverse translocation of classical protein kinase C (PKC) isoenzymes: requirement for kinase activity and carboxyl-terminal phosphorylation of PKC for the ceramide response. *FASEB J* 15:2401-2414.
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simson R, Sheets ED, Jacobson K (1995) Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys J* 69:989-993.
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- Singer WD, Brown HA, Bokoch GM, Sternweis PC (1995) Resolved phospholipase D activity is modulated by cytosolic factors other than Arf. *J Biol Chem* 270:14944-14950.
- Singer WD, Brown HA, Jiang X, Sternweis PC (1996) Regulation of phospholipase D by protein kinase C is synergistic with ADP-ribosylation factor and independent of protein kinase activity. *J Biol Chem* 271:4504-4510.
- Singh IN, Stromberg LM, Bourgoin SG, Sciorra VA, Morris AJ, Brindley DN (2001) Ceramide inhibition of mammalian phospholipase D1 and D2 activities is antagonized by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 40:11227-11233.
- Slaaby R, Du G, Altshuler YM, Frohman MA, Seedorf K (2000) Insulin-induced phospholipase D1 and phospholipase D2 activity in human embryonic kidney-293 cells mediated by the phospholipase C γ and protein kinase C α signalling cascade. *Biochem J* 351:613-619.
- Smith KJ, Scotland G, Beattie J, Trayer IP, Houslay MD (1996) Determination of the structure of the N-terminal splice region of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase RD1 (RNPDE4A1) by ^1H NMR and identification of the membrane association domain using chimeric constructs. *J Biol Chem* 271:16703-16711.
- Sobota A, Strzelecka-Kiliszek A, Gładkowska E, Yoshida K, Mrozińska K, Kwiatkowska K (2005) Binding of IgG-opsonized particles to Fc γ R is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *J Immunol* 175:4450-4457.
- Spang A (2013) Retrograde traffic from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a013391.
- Stace CL, Ktistakis NT (2006) Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1761:913-926.
- Stahelin RV, Ananthanarayanan B, Blatner NR, Singh S, Bruzik KS, Murray D, Cho W (2004) Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain. *J Biol Chem* 279:54918-54926.
- Stamnes M, Schiavo G, Stenbeck G, Söllner TH, Rothman JE (1998) ADP-ribosylation factor and phosphatidic acid levels in Golgi membranes during budding of coatamer-coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13676-13680.
- Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG (2011) The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 6:19-48.
- Steed PM, Clark KL, Boyar WC, Lasala DJ (1998) Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J* 12:1309-1317.
- Stojilkovic SS (2005) Ca $^{2+}$ -regulated exocytosis and SNARE function. *Trends Endocrinol Metab* 16:81-83.
- Stuart LM, Ezekowitz RA (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* 8:131-141.
- Stuart LM, Ezekowitz RAB (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22:539-550.
- Stuckey JA, Dixon JE (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol* 6:278-284.
- Stutchfield J, Cockcroft S (1993) Correlation between secretion and phospholipase D activation in differentiated HL60 cells. *Biochem J* 293:649-655.

Références bibliographiques

- Su W, Chen Q, Frohman MA (2009) Targeting phospholipase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis. *Future Oncol* 5:1477-1486.
- Suarez C, Kovar DR (2016) Intermolecular competition for monomers governs actin cytoskeleton organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:799-810.
- Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-477.
- Sugars JM, Celtek S, Manifava M, Coadwell J, Ktistakis NT (1999) Fatty acylation of phospholipase D1 on cysteine residues 240 and 241 determines localization on intracellular membranes. *J Biol Chem* 274:30023-30027.
- Sugars JM, Celtek S, Manifava M, Coadwell J, Ktistakis NT (2002) Hierarchy of membrane-targeting signals of phospholipase D1 involving lipid modification of a pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 277:29152-29161.
- Sugars JM, Celtek S, Manifava M, Coadwell J, Ktistakis NT (2002) Hierarchy of membrane-targeting signals of phospholipase D1 involving lipid modification of a pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 277:29152-29161.
- Sun Y, Fang Y, Yoon MS, Zhang C, Roccio M, Zwartkruis FJ, Armstrong M, Brown HA, Chen J (2008) Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8286-8291.
- Sung T-C, Altshuler YM, Morris AJ, Frohman MA (1999b) Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J Biol Chem* 274:494-502.
- Sung T-C, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Temel R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engebrecht J, Frohman MA (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 AJ, Frohman MA (1999a) Structural analysis of human phospholipase D1. *J Biol Chem* 274:3659-3666.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353.
- Swanson JA, Hoppe AD (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 76:1093-1103.

T

- Tabet R, Moutin E, Becker JAJ, Heintz D, Fouillen L, Flatter E, Krężel W, Alunni V, Koebel P, Dembélé D, Tassone F, Bardoni B, Mandel J-L, Vitale N, Muller D, Le Merrer J, Moine H (2016) Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E3619-E3628.
- Takahashi K, Tago K, Okano H, Ohya Y, Katada T, Kanaho Y (1996) Augmentation by calmodulin of ADP-ribosylation factor-stimulated phospholipase D activity in permeabilized rabbit peritoneal neutrophils. *J Immunol* 156:1229-1234.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
- Takatsu H, Yoshino K, Toda K, Nakayama K (2002) GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem J* 365:369-378.
- Taki T, Kanfer JN (1979) Partial purification and properties of a rat brain phospholipase. *J Biol Chem* 254:9761-9765.
- Takrama JF, Taylor KE (1991) A continuous spectrophotometric method for monitoring phospholipase D-catalyzed reactions of physiological substrates. *J Biochem Biophys Methods* 23:217-226.
- Tanguy E, Carmon O, Wang Q, Jeandel L, Chasserot-Golaz S, Montero-Hadjadje M, Vitale N (2016) Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J Neurochem* 137:904-912.
- Tanguy E, Kassas N, Vitale N (2018a) Protein-phospholipid interaction motifs: a focus on phosphatidic acid. *Biomolecules* 8:E20.

- Tanguy E, Wang Q, Coste de Bagneaux P, Fouillen L, Thahouly T, Ammar M-R, Vitale N (2018b) Different species of phosphatidic acid are produced during neuronal growth and neurosecretion. *OCL* 25:D408.
- Tanguy E, Wang Q, Moine H, Vitale N (2019) Phosphatidic acid: from pleiotropic functions to neuronal pathology. *Front Cell Neurosci* 13:2.
- Tanguy E, Wang Q, Vitale N (2018c) Role of phospholipase D-derived phosphatidic acid in regulated exocytosis and neurological disease. *Handb Exp Pharmacol*.
- Tao-Cheng J-H, Dosemeci A, Bressler JP, Brightman MW, Simpson DL (1995) Characterization of synaptic vesicles and related neuronal features in nerve growth factor and ras oncogene differentiated PC12 cells. *J Neurosci Res* 42:323-334.
- Tauber AI (2003) Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:897-901.
- Thomson FJ, Clark MA (1995) Purification of a phosphatidic-acid-hydrolysing phospholipase A₂ from rat brain. *Biochem J* 306:305-309.
- Tischler AS (2002) Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci* 971:366-370.
- Topham MK, Bunting M, Zimmerman GA, McIntyre TM, Blackshear PJ, Prescott SM (1998) Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase- ζ . *Nature* 394:697-700.
- Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, Foster DA (2009) Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol* 29:1411-1420.
- Trifaró J-M, Gasman S, Gutiérrez LM (2008) Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol* 192:165-172.
- Trifaró J-M, Lee RWH (1980) Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience* 5:1533-1546.
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel J-L, Sassone-Corsi P, Hanauer A (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384:567-570.
- Tryoen-Tóth P, Chasserot-Golaz S, Tu A, Gherib P, Bader M-F, Beaumelle B, Vitale N (2013) HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Sci* 126:454-463.

U

- Uchida N, Okamura S, Nagamachi Y, Yamashita S (1997) Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 123:280-285.
- Umbrecht-Jenck E, Demais V, Calco V, Bailly Y, Bader M-F, Chasserot-Golaz S (2010) S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic* 11:958-971.
- Underhill DM, Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12:492-502.
- Utter M, Chakraborty S, Goren L, Feuser L, Zhu Y-S, Foster DA (2018) Elevated phospholipase D activity in androgen-insensitive prostate cancer cells promotes both survival and metastatic phenotypes. *Cancer Letters* 423:28-35.

V

- Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467-480.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11:2295-2322.
- van Baal J, de Widt J, Divecha N, van Blitterswijk WJ (2005) Translocation of diacylglycerol kinase θ from cytosol to plasma membrane in response to activation of G protein-coupled receptors and protein kinase C. *J Biol Chem* 280:9870-9878.

Références bibliographiques

- van Dam EM, Robinson PJ (2006) Ral: mediator of membrane trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1841-1847.
- van den Bout I, Divecha N (2009) PIP5K-driven PtdIns(4,5)P₂ synthesis: regulation and cellular functions. *J Cell Sci* 122:3837-3850.
- van Meer G, de Kroon AIPM (2011) Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci* 124:5-8.
- van Meer G, Simons K (1988) Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36:51-58.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112-124.
- Vance JE, Vance DE (2004) Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 82:113-128.
- Venable ME, Bielawska A, Obeid LM (1996) Ceramide inhibits phospholipase D in a cell-free system. *J Biol Chem* 271:24800-24805.
- Vicogne J, Vollenweider D, Smith JR, Huang P, Frohman MA, Pessin JE (2006) Asymmetric phospholipid distribution drives in vitro reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14761-14766.
- Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol* 155:19-26.
- Vitale N (2010) Therapeutic potentials of recently identified PLD inhibitors. *Curr Chem Biol* 4:244-249.
- Vitale N, Caumont A-S, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader M-F (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20:2424-2434.
- Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bailly Y, Morinaga N, Frohman MA, Bader M-F (2002) Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J Cell Biol* 159:79-89.
- Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader M-F, Chasserot-Golaz S (2005) The small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280:29921-29928.

W

- Wade RH (2009) On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol* 43:177-191.
- Waksman M, Eli Y, Liscovitch M, Gerst JE (1996) Identification and characterization of a gene encoding phospholipase D activity in yeast. *J Biol Chem* 271:2361-2364.
- Walpole GFW, Grinstein S, Westman J (2018) The role of lipids in host-pathogen interactions. *IUBMB Life* 70:384-392.
- Wang KL, Khan MT, Roufogalis BD (1997) Identification and characterization of a calmodulin-binding domain in Ral-A, a Ras-related GTP-binding protein purified from human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 272:16002-16009.
- Wang L, Cummings R, Usatyuk P, Morris A, Irani K, Natarajan V (2002) Involvement of phospholipases D1 and D2 in sphingosine 1-phosphate-induced ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *Biochem J* 367:751-760.
- Wang S, Xu L, Zheng L (1994) Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* 269:20312-20317.
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res* 45:250-278.
- Wang Z, Zhang F, He J, Wu P, Tay LWR, Cai M, Nian W, Weng Y, Qin L, Chang JT, McIntire LB, Di Paolo G, Xu J, Peng J, Du G (2017) Binding of PLD2-generated phosphatidic acid to KIF5B promotes MT1-MMP surface trafficking and lung metastasis of mouse breast cancer cells. *Dev Cell* 43:186-197.
- Waselle L, Gerona RRL, Vitale N, Martin TFJ, Bader M-F, Regazzi R (2005) Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol Endocrinol* 19:3097-3106.

- Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho. *Science* 271:645-648.
- Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA (2009) Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1791:501-506.
- Whatmore J, Morgan CP, Cunningham E, Collison KS, Willison KR, Cockcroft S (1996) ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D activity is localized at the plasma membrane and intracellular organelles in HL60 cells. *Biochem J* 320:785-794.
- White MA, Vale T, Camonis JH, Schaefer E, Wigler MH (1996) A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J Biol Chem* 271:16439-16442.
- Wu B, Guo W (2015) The exocyst at a glance. *J Cell Sci* 128:2957-2964.

X

- Xie M, Jacobs LS, Dubyak GR (1991) Regulation of phospholipase D and primary granule secretion by P₂-purinergic- and chemotactic peptide-receptor agonists is induced during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *J Clin Invest* 88:45-54.
- Xie Z, Ho W-T, Exton JH (1998) Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. *J Biol Chem* 273:34679-34682.
- Xie Z, Ho W-T, 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* 275:24962-24969.
- Xu L, Shen Y, Joseph T, Bryant A, Luo J-Q, Frankel P, Rotunda T, Foster DA (2000) Mitogenic phospholipase D activity is restricted to caveolin-enriched membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 273:77-83.
- Xu Y, Seet L-F, Hanson B, Hong W (2001) The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem J* 360:513-530.

Y

- Yamamoto M, Hilgemann DH, Feng S, Bito H, Ishihara H, Shibasaki Y, Yin HL (2001) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress-fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J Cell Biol* 152:867-876.
- Yamazaki M, Zhang Y, Watanabe H, Yokozeki T, Ohno S, Kaibuchi K, Shibata H, Mukai H, Ono Y, Frohman MA, Kanaho Y (1999) Interaction of the small G protein RhoA with the C terminus of human phospholipase D1. *J Biol Chem* 274:6035-6038.
- Yang J-S, Gad H, Lee SY, Mironov A, Zhang L, Beznoussenko GV, Valente C, Turacchio G, Bonsra AN, Du G, Baldanzi G, Graziani A, Bourgoin S, Frohman MA, Luini A, Hsu VW (2008) A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance. *Nat Cell Biol* 10:1146-1153.
- Yang SF, Freer S, Benson AA (1967) Transphosphatidylolation by phospholipase D. *J Biol Chem* 242:477-484.
- Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16:964-975.
- Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S (2008) Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319:210-213.
- Yoon M-S, Sun Y, Arauz E, Jiang Y, Chen J (2011) Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506 binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect. *J Biol Chem* 286:29568-29574.
- Yoon M-S, Yon C, Park S-Y, Oh D-Y, Han AH-J, Kim D-S, Han J-S (2005) Role of phospholipase D1 in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329:804-811.

Références bibliographiques

- Yoshimura S, Sakai H, Ohguchi K, Nakashima S, Banno Y, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y (2002) Changes in the activity and mRNA levels of phospholipase D during ceramide-induced apoptosis in rat C6 glial cells. *J Neurochem* 69:713-720.
- Yu H, Li X, Marchetto GS, Dy R, Hunter D, Calvo B, Dawson TL, Wilm M, Anderegge RJ, Graves LM, Earp HS (1996) Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 271:29993-29998.

Z

- Zeniou M, Pannetier S, Fryns J-P, Hanauer A (2002) Unusual splice-site mutations in the RSK2 gene and suggestion of genetic heterogeneity in Coffin-Lowry syndrome. *Am J Hum Genet* 70:1421-1433.
- Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanich ME, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader M-F, Vitale N (2008) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8434-8439.
- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeblerlé AM, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader M-F, Vitale N (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* 282:21746-21757.
- Zhang P, Reue K (2017) Lipin proteins and glycerolipid metabolism: Roles at the ER membrane and beyond. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859:1583-1595.
- Zhang Q, Cox D, Tseng C-C, Donaldson JG, Greenberg S (1998) A requirement for ARF6 in Fcγ Receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 273:19977-19981.
- Zhang Y, Akhtar RA (1998) Epidermal growth factor stimulates phospholipase D independent of phospholipase C, protein kinase C or phosphatidylinositol-3 kinase activation in immortalized rabbit corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 17:294-300.
- Zhang Y, Altshuler YM, Hammond SM, Morris AJ, Frohman MA (1999) Loss of receptor regulation by a phospholipase D1 mutant unresponsive to protein kinase C. *EMBO J* 18:6339-6348.
- Zhang Y, Huang P, Du G, Kanaho Y, Frohman MA, Tsirka SE (2004) Increased expression of two phospholipase D isoforms during experimentally induced hippocampal mossy fiber outgrowth. *Glia* 46:74-83.
- Zhao Y, Ehara H, Akao Y, Shamoto 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* 278:140-143.
- Zhao Y, Stuckey JA, Lohse DL, Dixon JE (1997) Expression, characterization, and crystallization of a member of the novel phospholipase D family of phosphodiesterases. *Protein Science* 6:2655-2658.
- Zhong M, Shen Y, Zheng Y, Joseph T, Jackson D, Foster DA (2003) Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 302:615-619.
- Zhou D, Luini W, Bernasconi S, Diomede L, Salmons M, Mantovani A, Sozzani S (1995) Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce haptotactic migration of human monocytes. *J Biol Chem* 270:25549-25556.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 253:162-168.
- Zhu Y-B, Kang K, Zhang Y, Qi C, Li G, Yin D-M, Wang Y (2012) PLD1 negatively regulates dendritic branching. *J Neurosci* 32:7960-7969.

Annexes

Annexes

Activités de pédagogie et de médiation scientifique

1) Enseignement à la Faculté des Sciences de la Vie de Strasbourg

Enseignement de la matière « Histologie et Cytologie », dans la discipline « Biologie Animale - Biologie Cellulaire », niveau 1^{ère} année de Licence

- Octobre 2015 à août 2018 : 66 heures de travaux dirigés par an (contrat de monitorat)
- Septembre à août 2019 : 96 heures de travaux dirigés (contrat d'ATER à 50%)

2) Encadrement de stagiaires au laboratoire

- 2016 à 2018 (période mai-juin) : encadrement d'étudiants de 1^{ère} année de Licence en Sciences de la Vie, durant un stage de découverte de 2 semaines
- Janvier à juin 2018 : encadrement d'une étudiante du Master 2 Neurosciences de Strasbourg

3) Responsabilités en pédagogie (association Doctoneuro)

- Septembre 2016 : organisation de la journée d'accueil des étudiants du Master Neurosciences de Strasbourg
- Octobre 2016 et 2017 : animation d'ateliers scientifiques durant la Fête de la Science (Palais Universitaire de Strasbourg et médiathèque de Lingolsheim)
- Décembre 2017 : animation scientifique lors de la journée du Téléthon
- Juin 2017 et 2018 : participation à l'entraînement des étudiants du Master 2 Neurosciences de Strasbourg pour la préparation de leur soutenance
- Juillet 2018 : participation à l'entraînement des étudiants du Master 2 Neurosciences de Strasbourg pour la préparation du concours d'attribution des contrats doctoraux

4) Médiation scientifique (Jardin des Sciences de Strasbourg)

- Juin 2016 : conception et animation des ateliers « Les Mystères du Cerveau », destinés à des collégiens (journée « Kids University »)
- Septembre 2016 et octobre 2017 : animation de conférences sur le quotidien d'un doctorant, pour des lycéens de filière scientifique
- 2018 : participation à la demi-finale régionale du concours « Ma thèse en 180 secondes »

5) Autres activités de médiation scientifique

Décembre 2018 : participation à « DECLICS » (Speed meeting scientifique avec des lycéens)

Liste des communications scientifiques

1) Communications affichées :

Implication of phosphatidic acid in regulated exocytosis during neurosecretion.

Tanguy E., Coste de Bagneaux P., Wang Q., Ammar M.-R., Chasserot-Golaz S., Bailly Y., Haeberle A.-M., Bader M.-F., and Vitale N.

Congrès Européen des Doubles Coursus Médecine/Pharmacie-Sciences (Juin 2016 - Strasbourg)

Regulation of secretory granules exocytosis by phospholipase D-derived phosphatidic acid.

Tanguy E., Coste de Bagneaux P., Wang Q., Ammar M.-R., Chasserot-Golaz S., Bailly Y., Haeberle A.-M., Bader M.-F., and Vitale N.

42^{ème} colloque de la Société de Neuroendocrinologie (Septembre 2017 - Dijon)

2) Communications orales :

Regulation of secretory granule motion by phospholipase D.

Tanguy E. and Vitale N.

Workshop on Membrane Lipidology, University of Strasbourg & RIKEN Institute (Mars 2017 - Strasbourg)

(Blitz) Role of phospholipase D-derived phosphatidic acid in calcium-regulated exocytosis.

Tanguy E., Coste de Bagneaux P., Wang Q., Ammar M.-R., Chasserot-Golaz S., Bailly Y., Haeberle A.-M., Bader M.-F., and Vitale N.

Federative Day for Neuroscience in Strasbourg (Avril 2018 - Strasbourg)

Multiple regulatory functions of phospholipase D-derived phosphatidic acid in neuroendocrine secretion.

Tanguy E., Coste de Bagneaux P., Wang Q., Ammar M.-R., Chasserot-Golaz S., Bailly Y., Haeberle A.-M., Bader M.-F., and Vitale N.

21^{ème} congrès annuel du Club Exocytose-Endocytose (Mai 2018 - Sant Feliu de Guixols, Espagne)

Liste des publications annexes

Different species of phosphatidic acid are produced during neuronal growth and neurosecretion.

Tanguy E., Wang Q., Coste de Bagneaux P., Fouillen L., Thahouly T., Ammar M.-R., and Vitale N.
Oilseeds and fats, Crops and Lipids. 2018, 25(4), D408. <https://doi.org/10.1051/ocl/2018024>

(Revue) Protein-phospholipid interaction motifs: a focus on phosphatidic acid.

Tanguy E., Kassas N., and Vitale N.
Biomolecules. 2018 Apr; 8(2). pii: E20

(Revue) Phosphatidic acid: from pleiotropic functions to neuronal pathology.

Tanguy E., Wang Q., Moine H., and Vitale N.
Frontiers in Cellular Neuroscience. 2019 Jan; 13:2

Bovine chromaffin cells: culture and fluorescent assay for secretion

Thahouly T., Tanguy E., Raherindratsara J., Bader M.-F., Chasserot-Golaz S., Gasman S., and Vitale N.
Methods in Molecular Biology (en soumission)

Topical issue on:

LIPIDS & BRAIN IV: LIPIDS IN ALZHEIMER'S DISEASE
LIPIDS & BRAIN IV: LES LIPIDES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

REVIEW

OPEN ACCESS

Different species of phosphatidic acid are produced during neuronal growth and neurosecretion

Emeline Tanguy¹, Qili Wang¹, Pierre Coste de Bagneaux¹, Laetitia Fouillen², Tamou Thahouly¹, Mohamed-Raafet Ammar¹ and Nicolas Vitale^{1,3,*}

¹ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212, Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France

² Laboratoire de Biogénèse Membranaire, UMR-5200 CNRS, Plateforme Métabolome, Université de Bordeaux, 33883 Villenave D'Ornon, France

³ INSERM, 75654, Paris cedex 13, France

Received 24 January 2018 – Accepted 15 March 2018

Abstract – Although originally restricted to their structural role as major constituents of membranes, lipids are now well-defined actors to integrate intracellular or extracellular signals. Accordingly, it has been known for decades that lipids, especially those coming from diet, are important to maintain normal physiological functions and good health. This is especially the case to maintain proper cognitive functions and avoid neuronal degeneration. But besides this empiric knowledge, the exact molecular nature of lipids in cellular signaling, as well as their precise mode of action are only starting to emerge. The recent development of novel pharmacological, molecular, cellular and genetic tools to study lipids *in vitro* and *in vivo* has contributed to this improvement in our knowledge. Among these important lipids, phosphatidic acid (PA) plays a unique and central role in a great variety of cellular functions. This article will review the different findings illustrating the involvement of PA generated by phospholipase D (PLD) and diacylglycerol kinases (DGK) in the different steps of neuronal development and neurosecretion. We will also present lipidomic evidences indicating that different species of PA are synthesized during these two key neuronal phenomena.

Keywords: exocytosis / neuroendocrine / neuron / phospholipase D / phosphatidic acid

Résumé – Différentes formes d'acide phosphatidique sont produites au cours de la croissance neuronale et la neurosécrétion. Bien qu'originellement restreints à leur rôle majeur de constituants principaux des membranes, il est maintenant communément admis que certains lipides possèdent également une fonction importante d'intégration des signaux intra- ou extra-cellulaires. En accord avec cette notion, cela fait des décennies qu'il est reconnu que les lipides, principalement *via* l'alimentation, jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de nombreuses fonctions physiologiques et dans la santé humaine au sens large. Ceci est particulièrement le cas pour la conservation d'un niveau optimal des fonctions cognitives et pour lutter contre la dégénérescence neuronale. Toutefois, malgré ces connaissances empiriques, la nature exacte des lipides impliqués, ainsi que les mécanismes d'action mis en jeu peinent à émerger. Le développement récent de nouveaux outils génétiques, moléculaires, et pharmacologiques pour étudier les lipides *in vitro* et *in vivo* permettent à présent d'améliorer nos connaissances. Parmi ces lipides, l'acide phosphatidique joue un rôle particulier et central dans diverses fonctions cellulaires essentielles. Cet article résume les observations récentes qui illustrent que l'acide phosphatidique, produit par deux voies enzymatiques distinctes impliquant les phospholipases D et les diacylglycérol-kinases, est impliqué dans le développement neuronal et la neurosécrétion. Pour finir, nous présentons des résultats d'analyses lipidomiques qui indiquent que différentes formes de l'acide phosphatidique sont produites au cours de ces deux processus neuronaux majeurs.

Mot clés : acide phosphatidique / exocytose / neuroendocrine / neurone / phospholipase D

*Correspondence: vitalen@inci-cnrs.unistra.fr

1 Introduction

Normal brain function requires the establishment of specific neuronal networks mediated by synapses (*i.e.* structures allowing chemical or electrical communication between neurons). Indeed, during their development, neurons exhibit various morphological and structural changes including axon and dendrite outgrowth, dendritic branching and ramification and spine development that ultimately allow synapse formation and maintenance, which are critical events in the establishment of neuronal networks (Dotti *et al.*, 1988). Further, neuronal development and maturation require plasma membrane expansion and rearrangement provided essentially by two membrane trafficking mechanisms: exocytosis and endocytosis (Gasman and Vitale, 2017). In a first part, exocytosis supports intracellular membrane supply required for the plasma membrane enlargement as well as neurotrophins receptor and neuronal adhesion molecules membrane expression that insure synapse formation and maintenance (Sytnyk *et al.*, 2017). In a second part, endocytosis insures intercellular signal integration required as well for synaptic formation and specificity. Moreover, membrane lipids composition has emerged as an important player during membrane trafficking and cell signaling. Further, it is tempting to speculate that specific lipids and their dynamics are critically important for membrane reorganization and neuronal development.

Among all the lipids, phosphatidic acid (PA) appears to have a particular function in these membrane-related phenomena's. PA is the simplest glycerophospholipid and plays a key structural role as a precursor of most glycerophospholipids, but it is also considered as an important player in the transmission, amplification and regulation of a variety of intracellular signaling and cellular functions (Ammar *et al.*, 2014). At the molecular level, this signaling PA could interact with various proteins to modulate their catalytic activity and/or their membrane association including GTPases, kinases, phosphatases, nucleotide binding proteins and phospholipases (Ammar *et al.*, 2013a, 2014). Furthermore, many PA partners have been involved in the modulation of actin dynamics and membrane trafficking as well as neuronal development. In this article, we will describe and discuss our observations suggesting that PA contributes to the cellular and molecular mechanisms that govern neuronal development and neurosecretion. Moreover, we will present our recent findings suggesting that various PA species are differently synthesized during neurite outgrowth and neurosecretion.

2 PA is involved in neurosecretion

The PA biosynthetic pathway involves mostly three families of enzymes (Fig. 1): phospholipases D (PLD), diacylglycerol kinases (DGK), and lysophosphatidic-acyl-transferases (LPAAT), which has made difficult accurate modulation of cellular PA to evaluate its contribution to neuronal function. Use of ethanol as an inhibitor of PA synthesis by PLD was at first probably the most used approach and has led to the notion that PLD-generated PA plays a role in various membrane trafficking events, especially during endocytosis and regulated exocytosis in different cell types

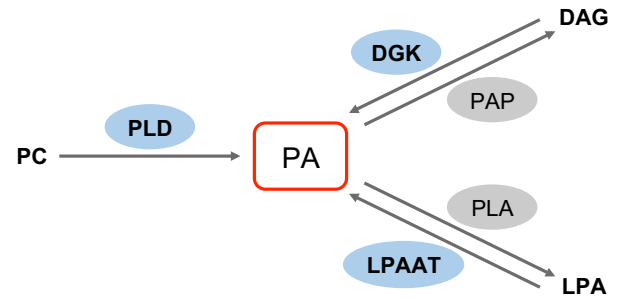


Fig. 1. Biosynthetic pathways of structural and signaling PA. PA is a central phospholipid for biosynthetic and signaling reactions. Enzymes in blue denote biosynthetic reactions that lead to structural and signaling PA synthesis whereas enzymes involved in PA catabolism are shown in grey.

including chromaffin cells, neurons, epithelial and mast cells (Caumont *et al.*, 1998; Bader and Vitale, 2009; Ammar *et al.*, 2013a; Kassas *et al.*, 2017; Tanguy *et al.*, 2016,2018). Molecular tools and pharmacological inhibitors of PLDs have indicated that among PLDs, PLD1 is the isoform mostly involved in membrane trafficking. It must be noted however, that DGK-generated PA has been reported to be involved as well in membrane trafficking (Lopez *et al.*, 2012).

Chromaffin cells are neuroendocrine cells originating from the neural crest and have taken a prominent place in the models that have provided important insight into the molecular machinery underlying the successive steps of neurosecretion and exocytosis at large (Bader *et al.*, 2002). Thus, by offering the opportunity to combine the use of recent electrophysiological and biophysical techniques allowing single-vesicle resolution together with specific biochemical modifications in the machinery involved in exocytosis, chromaffin cells allowed the identification of most molecular players that orchestrate the formation, targeting, docking, and fusion of secretory granules. In fact, our early evidence obtained from chromaffin cells injected with a dominant-negative PLD1 mutant supported a function for PLD1-generated PA in the late steps of exocytosis, such as membrane fusion and/or pore expansion (Vitale *et al.*, 2001). Similarly, injection in *Aplysia* neurons blocked ACh release by reducing the number of active presynaptic releasing sites supporting evidence that PLD1 also plays a major role in neurotransmission, most likely by controlling the fusogenic status of presynaptic release sites (Humeau *et al.*, 2001). Later, PLD1 silencing experiments reinforced this model as a decrease in the fusion rate of single secretory granule release was observed (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Interestingly, RSK2 was shown to be an important regulator of PLD1 activity in neurosecretion (Vitale, 2010). Since loss-of-function mutations of RSK2 are responsible for the Coffin-Lowry syndrome (CLS), an X-linked inherited mental retardation disease, the later observations suggest that the symptoms of CLS could result from alteration of neuronal development but also neuronal activity (Zeniou-Meyer *et al.*, 2008). Using similar tools, PLD1-generated PA was also reported to contribute actively to the regulated secretion of insulin from β -pancreatic cells (Waselle *et al.*, 2005), and of von Willebrand factor from endothelial cells (Disse *et al.*, 2009). Another established role for PA in secretion relates to

the induction of neutrophil exocytosis from azurophilic granules by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (Williams *et al.*, 2007). Moreover, the ability of apicomplexan parasites to invade and later exit infected cells relies on specialized organelles termed micronemes that release their contents including adhesins, perforins and proteases in a PA-dependent manner (Bullen *et al.*, 2016).

Yet, the mechanism(s) by which PA promotes membrane fusion remains debated. It may be linked to its ability to generate membrane curvature and facilitate fusion, modulate specific protein activity involved in the docking of vesicles and/or recruit key proteins required for the fusion process (Tanguy *et al.*, 2018). The most widely accepted model for membrane fusion involves a combination of protein and lipid elements at the fusion site. Cone-shaped lipids, such as PA, have been proposed to facilitate fusion through their intrinsic negative curvatures when accumulating in the inner (cis) leaflets of contacting bilayers. Furthermore, PA forms highly charged microdomains, which serve as membrane insertion sites for numerous proteins important for exocytosis (Lam *et al.*, 2008) and could induce conformational changes in associated proteins (Iversen *et al.*, 2015). More directly, PA has been proposed to contribute to many biological processes through its ability to interact with positively charged domains of numerous proteins (Jenkins and Frohman, 2005). Finally, PA can also directly serve as source for synthesis of DAG, or activate PI-5 kinase producing PtdIns(4,5)P₂, both lipids playing positive function in exocytosis.

3 PA is involved in neuronal outgrowth and development

Ethanol as an inhibitor of PA synthesis by PLDs was also widely used in the field of neuron development and has led to a well-accepted model where PLD-generated PA is crucial to neurite outgrowth in a variety of neuronal cell models (Kanaho *et al.*, 2009). In agreement with this model, we recently observed that neuronal maturation was significantly delayed in cortical *Pld1* knockout neurons culture (Ammar *et al.*, 2013b). However, the mechanisms implicating PA in the underlying membrane trafficking events remained elusive. Using the cell culture models of PC12 cells treated by neuronal growth factor (NGF), which have been widely used as a model to assess neurite outgrowth, we found that the PA sensor Spo20p-GFP accumulated at the plasma membrane following NGF stimulation as well as at the tips of growing neurites. Moreover, we found that PLD1 inhibition abolished PA accumulation induced by NGF, suggesting that PLD1 activation mediates PA synthesis in this process (Ammar *et al.*, 2013b). Interestingly, we found that PLD1 is associated to the trans Golgi-derived vesicular structures containing VAMP-7/TiVAMP, a SNARE protein involved in neurite outgrowth (Martinez-Arca *et al.*, 2000). Moreover, we have shown that PLD1 positive-vesicles move anterogradely and retrogradely in the developing neurites and accumulate at the growth cone (Ammar *et al.*, 2013b). Furthermore, we found that the specific PLD1 inhibitors dramatically reduced membrane supply required for neurite outgrowth by reducing the fusion rate of these VAMP-7 positive vesicles (Ammar *et al.*, 2013b). This appears as the first direct involvement of

PA-mediated membrane trafficking in neurite outgrowth (Fig. 2). Of note, expression of the PA sensor Spo20-GFP in PC12 cells strongly reduces the number and length of the NGF-induced neurites most likely as a consequence of PA quenching by the probe (Ammar *et al.*, 2013b). It is thus tempting to speculate that PA acts in part by recruiting key proteins at the vesicle fusion site during neurite outgrowth (Fig. 2).

Pld1 knockout also affects a later step in neuronal development with a specific reduction in the number of secondary branching dendrites in cortical neurons. Additionally, the density of the spines, the tiny protrusions (0.5 μm wide, 2 μm long) on neuronal dendrites that receive the majority of excitatory synaptic inputs, is significantly reduced in *Pld1*^{-/-} cortical neurons and this reduction in spine density specifically affects mushroom and branched spines, which are the forms of mature spines (Ammar *et al.*, 2013b). Accordingly, a previous report showed that the GTPase RalB promotes branching through a pathway involving PLD (Lalli and Hall, 2005). Altogether, these results imply critical functions of PLD1-produced signaling PA in early stages of neuronal growth and development, largely through an effect on cytoskeleton organization (Fig. 2). Intriguingly we found that neurons cultured from mice lacking ribosomal S6 kinase 2 (*Rsk2*), a model for the CLS (Humeau *et al.*, 2009), exhibit a significant delay in growth in a similar way to that shown by neurons cultured from *Pld1* knockout mice (Ammar *et al.*, 2013b). Furthermore, gene silencing of *Rsk2* as well as acute pharmacological inhibition of RSK2 in PC12 cells strongly impaired NGF-induced neurite outgrowth like it was found after *Pld1* silencing or PLD1 inhibition (Ammar *et al.*, 2013b). Expression of phosphomimetic PLD1(T147D) or PLD1(T147E) mutants rescued the inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells silenced for RSK2, revealing that PLD1 is a major target for RSK2 in neurite formation and allowing us to propose that the loss of function mutations in *RSK2* that leads to CLS and neuronal deficits are related to defects in neuronal growth due to impaired RSK2-dependent PLD1 activity resulting in a reduced vesicle fusion rate and membrane supply. On the other hand, we also found that PLD1 regulates BDNF signaling endosomes in cortical neurons *via* ERK1/2 and CREB. This effect could explain in part the reduction of dendritic ramification observed in *Pld1*^{-/-} cortical neurons (Ammar *et al.*, 2015).

PA generated by DGK also seems to modulate dendrite ramification and spines maturation. For instance, overexpression of wild-type DGKβ promotes dendrite outgrowth and spine maturation in transfected hippocampal neurons, whereas a kinase-dead mutant DGK has no effect (Hozumi *et al.*, 2009). Accordingly, reduced number of branches and spines was found in primary cultured hippocampal neurons from DGKβ knockout compared to the wild type (Shirai *et al.*, 2010). DGKζ has also been reported to be important for the maintenance of dendritic spines and the regulation of the PA/DAG balance at excitatory synapses (Kim *et al.*, 2009, 2010) (Fig. 2). Indeed the C-terminal PDZ-binding motif of DGKζ interacts with the PDZ domains of the postsynaptic density protein PSD-95, an abundant postsynaptic scaffolding protein that regulates excitatory synaptic structure and function. This interaction promotes synaptic localization of DGKζ. Functionally, DGKζ overexpression increases spine density in cultured hippocampal neurons in a manner that

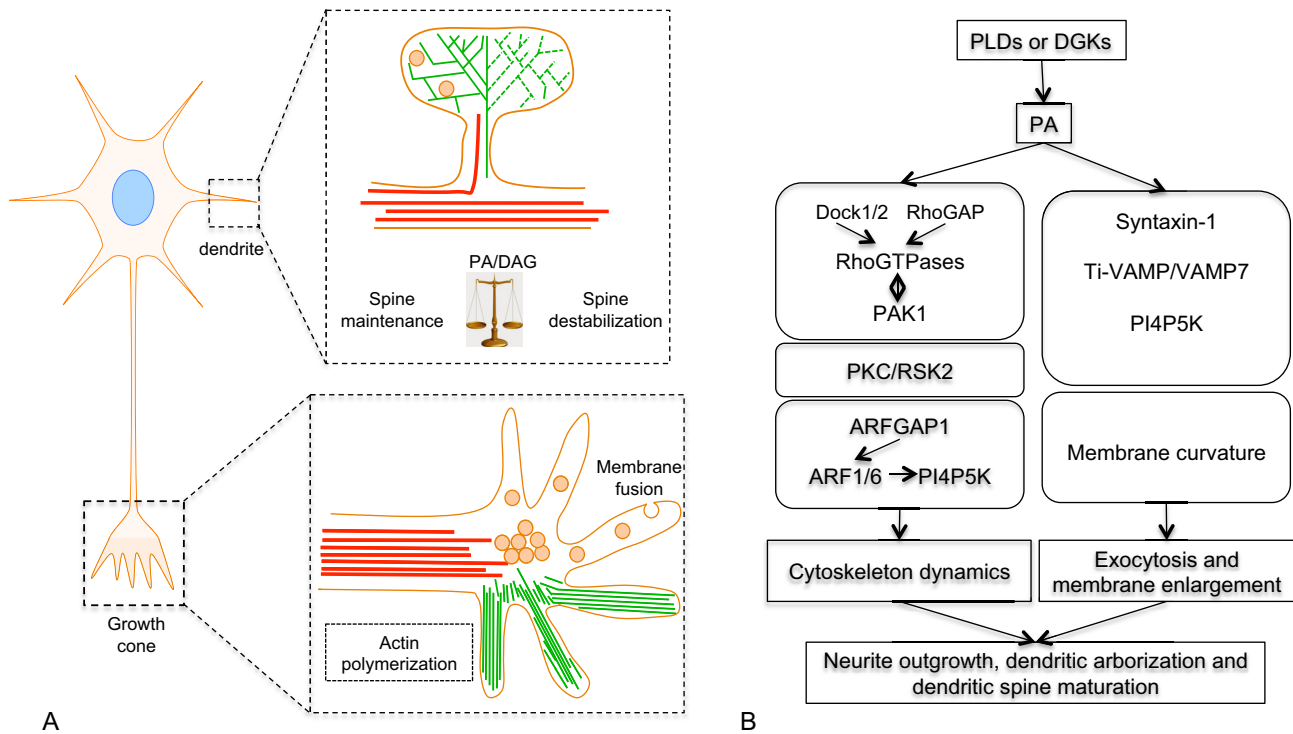


Fig. 2. PA is involved in axon and dendrite outgrowth, dendrite branching and spine formation. A) Schematic representation of growth cone and dendritic spines with actin cytoskeleton (green) and microtubules (red) as well as trafficking vesicles. In dendrites, PA/DAG balance controls the actin cytoskeleton dynamics whereas in growth cones, PA is involved in neurite outgrowth by controlling actin organization and vesicular trafficking for membrane supply. B) Examples of potential molecular targets of PA involved in cytoskeleton dynamics and vesicular exocytosis.

requires DGK catalytic activity but also PSD-95 binding, whereas knockdown of DGK ζ decreases spine density. Moreover, mice deficient for *dgk ζ* expression show a reduction in spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons and exhibit reduced excitatory synaptic transmission. Time-lapse imaging of *dgk ζ* -deficient neurons revealed impaired spine maintenance but not formation (Kim *et al.*, 2009). Finally, it was recently reported that *Dgk κ* silencing in CA1 region of mouse organotypic hippocampal slices causes a strong increase of abnormally long and multi-headed spines and a marked decrease of the proportion of mature spines whereas spine density remains unaffected (Tabet *et al.*, 2016a). In addition, reduced *Dgk κ* expression accelerated spine turnover, as indicated by the increased rate of spine formation and elimination, associated with spine instability (Tabet *et al.*, 2016a). Interestingly these structural defects are very similar to those previously observed in the *Fmr1*^{-/-} mice, a model for fragile X syndrome (He and Portera-Cailliau, 2013), and it was shown that *Dgk κ* overexpression within *Fmr1*^{-/-} neurons could rescue the dendritic spine phenotype (Tabet *et al.*, 2016a,b). Taken together, these data also reveal a key role of DGK-generated PA in dendritic ramification and spine formation and maturation.

4 PA synthesis during neurosecretion and neuronal growth

Like all phospholipids, PA comes in different flavors based on the fatty acid composition. Indeed although in mammalian

cells only saturated fatty acids are found in sn1 position, in the sn2 position fatty acids can be saturated, mono-unsaturated, or poly-unsaturated. We performed a lipidomic analysis on cultured PC12 cells stimulated for exocytosis by a 10-minute incubation with a depolarizing K⁺ solution to identify the different PA species produced during neurosecretion. The levels of medium and long carbon chains mono- and poly-unsaturated forms of PA were increased after cell stimulation (Fig. 3). These results highlight the potential importance of different PA species in catecholamine secretion. In conclusion, the local build-up of different PA species together with other key lipids such as PtdIns(4,5)P₂, DAG, and cholesterol presumably at the neck or near the fusion pore could contribute by changing membrane curvature, together with SNARE mediated membrane apposition and destabilization, to promote fusion pore formation and/or regulate its stability. It must also be noted that the contribution of PA in early steps of the secretory pathway has not been as well investigated (Gasman and Vitale, 2017).

Similarly, we performed a lipidomic analysis on cultured PC12 cells treated with NGF for 3 days. Among the 10 most abundant PA species detected, a specific increase in the long carbon chain forms 38:1, 38:2 and 40:6 was found, whereas levels of other PA especially saturated ones were not modified (Fig. 3). This observation therefore suggests that mono-unsaturated, bis-unsaturated, and/or the omega 3 poly-unsaturated forms of PA contribute to neurite outgrowth and neuronal development. In line with this finding, it has been known for a long time that dietary omega 3 poly-unsaturated lipids such as docosahexanoic acid (DHA) and eicosapenta-

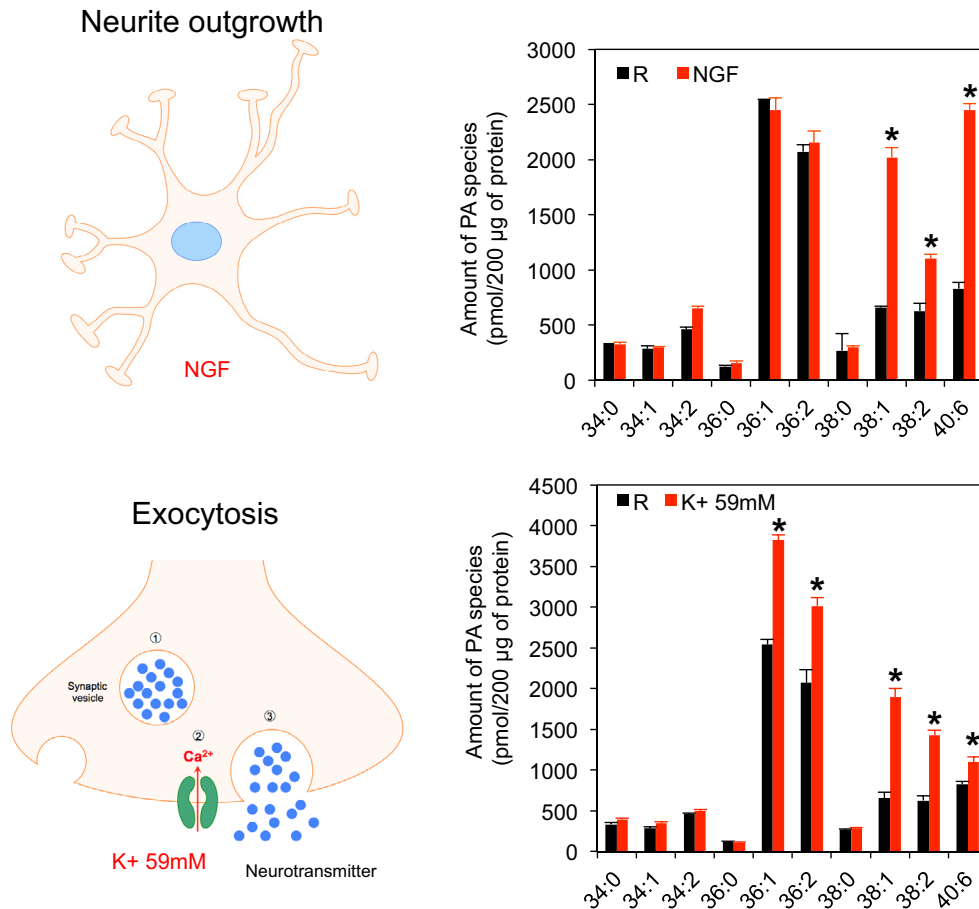


Fig. 3. Synthesis of different PA species during neurosecretion and neurite outgrowth. PC12 cells were either treated with 10 μ M of NGF for 3 days to stimulate neurite outgrowth (Ammar *et al.*, 2013a,b) or with a 59 mM potassium solution for 10-minutes to stimulate catecholamine neurosecretion (Béglé *et al.*, 2009). Cells were washed with ice cold PBS, before being lysed as described previously (Vitale *et al.*, 2002). Proteins levels were quantified and levels of 40 different PA species were estimated in 200 μ g fractions by lipidomic analysis (Kassas *et al.*, 2017). The levels of the 10 most abundant PA species are shown and expressed as pmol/200 μ g of proteins. The total carbon chain length and saturation is indicated for each PA species. Results were obtained from 3 independent experiments (* $p < 0.001$).

noic acid (EPA) have a beneficial cognitive effects (Cardoso *et al.*, 2016). Although many important functions for the brain have been attributed to DHA for instance, the mechanism of its incorporation into glycerophospholipids is unknown. Of interest, lysophosphatidic acid acyltransferases 4 (LPAAT4) has been recently suggested to play a role for maintaining DHA in neural membranes (Eto *et al.*, 2014). A combination of lipidomic approach and specific inhibitors for the multiple families of enzymes involved in the production and metabolism of PA will be helpful to define more precisely the nature of distinct PA species involved in the different steps of neuronal development and activity.

5 Conclusion

In this paper, we investigated the possibility that the fatty-acyl chain composition affects the functions of PA in neuronal development and exocytosis, an aspect of PA that has not been investigated with care yet. For instance, do the various PAs displaying saturated, mono-, bi- or poly-unsaturated fatty acids

have similar effects on membrane topology or recruit the same proteins? These questions are especially relevant in the context of neuronal development and degeneration, since many studies have highlighted key functions of dietary lipids in human cognitive activity (Tolias *et al.*, 1998; Haast and Kiliaan 2015). We indeed found that neurite outgrowth and neurosecretion stimulation increased levels of multiple PA species. Interestingly, however, some of these increased PA species are similar and some others are not, suggesting that convergent and divergent mechanisms involving these different PA forms are present in these two important neuronal processes. The numerous genetic models now available, the recent progress in lipidomics, and some novel tools to study PA's function will be helpful to clarify the intriguing questions raised by these findings.

This work also opens new avenue on the possible contribution of PA and enzymes involved in PA synthesis in various neuronal pathologies such as Alzheimer's disease and autism spectrum disorders. In line with this possibility, the group of Gil di Paolo reported that PLD2 knockdown efficiently prevented cognitive loss in a mice model of

Alzheimer's disease (Oliveira *et al.*, 2010). Finally, the findings that an alteration of DAG/PA balance could be responsible for some of the symptoms of fragile X syndrome (Tabet *et al.*, 2016a,b), also points to perturbation of PA synthesis as a major source of neuronal malfunction.

Acknowledgments. This work was supported by grants from “La Ligue Contre le Cancer” and from “Fondation pour la Recherche Médicale” to NV. The Metabolome facility of Bordeaux was supported by the grant MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010.

References

- Ammar MR, Humeau Y, Hanauer A, Nieswandt B, Bader MF, Vitale N. 2013a. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neuritis outgrowth through phosphorylation of phospholipase D1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid. *J Neurosci* 33(50): 19470–19479.
- Ammar MR, Kassas N, Chasserot-Golaz S, Bader MF, Vitale N. 2013b. Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 125.
- Ammar MR, Kassas N, Bader MF, Vitale N. 2014. Phosphatidic acid in neuronal development: a node for membrane and cytoskeleton rearrangements. *Biochimie* 107: 51–57. DOI: [10.1016/j.biochi.2014.07.026](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.026).
- Ammar MR, Thahouly T, Hanauer A, Stegner D, Nieswandt B, Vitale N. 2015. PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Sci Rep* 5: 14778.
- Bader MF, Vitale N. 2009. Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1791(9): 936–941.
- Bader MF, Holz RW, Kumakura K, Vitale N. 2002. Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann NY Acad Sci* 971: 178–83.
- Béglé A, Tryoen-Tóth P, de Barry J, Bader MF, Vitale N. 2009. ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 284(8): 4836–4845.
- Bullen HE, Jia Y, Yamaryo-Botté Y, *et al.* 2016. Phosphatidic acid-mediated signaling regulates microneme secretion in toxoplasma. *Cell Host Microbe* 19(3): 349–360.
- Cardoso C, Afonso C, Bandarra NM. 2016. Dietary DHA and health: cognitive function ageing. *Nutr Res Rev* 29(2): 281–294.
- Caumont AS, Galas MC, Vitale N, Aunis D, Bader MF. 1998. Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J Biol Chem* 273(3): 1373–1379.
- Disse J, Vitale N, Bader MF, Gerke V. 2009. Phospholipase D1 is specifically required for regulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood* 113(4): 973–980.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8(4): 1454–1468.
- Eto M, Shindou H, Shimizu T. 2014. A novel lysophosphatidic acid acyltransferase enzyme (LPAAT4) with a possible role for incorporating docosahexaenoic acid into brain glycerophospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 443(2): 718–724.
- Gasman S, Vitale N. 2017 Lipid remodelling in neuroendocrine secretion. *Biol Cell* 109(11): 381–390.
- Haast RA, Kiliaan AJ. 2015. Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 92: 3–14.
- He CX, Portera-Cailliau C. 2013. The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience* 251: 120–128.
- Hozumi Y, Watanabe M, Otani K, Goto K. 2009. Diacylglycerol kinase beta promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. *BMC Neurosci* 10: 99.
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, *et al.* 2001. A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(26): 15300–15305.
- Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N. 2009. X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem* 109(1): 1–14.
- Iversen L, Mathiasen S, Larsen JB, Stamou D. 2015. Membrane curvature bends the laws of physics and chemistry. *Nat Chem Biol* 11(11): 822–825.
- Jenkins GM, Frohman MA. 2005. Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20): 2305–2316.
- Kanaho Y, Funakoshi Y, Hasegawa H. 2009. Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. *Biochim Biophys Acta* 1791(9): 898–904.
- Kassas N, Tanguy E, Thahouly T, *et al.* 2017. Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J Biol Chem* 292(10): 4266–4279.
- Kim K, Yang J, Zhong XP, *et al.* 2009. Synaptic removal of diacylglycerol by DGKzeta and PSD-95 regulates dendritic spine maintenance. *EMBO J* 28(8): 1170–1179.
- Kim K, Yang J, Kim E. 2010. Diacylglycerol kinases in the regulation of dendritic spines. *J Neurochem* 112(3): 577–587.
- Lalli G, Hall A. 2005. Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J Cell Biol* 171(5): 857–869.
- Lam IP, Siu FK, Chu JY, Chow BK. 2008. Multiple actions of secretin in the human body. *Int Rev Cytol* 265: 159–190.
- Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA. 2012. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol* 33(8): 406–412.
- Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, *et al.* 2000. Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* 149(4): 889–900.
- Oliveira TG, Chan RB, Tian H, *et al.* 2010. Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *J Neurosci* 30(49): 16419–16428.
- Shirai Y, Kouzuki T, Kakefuda K, *et al.* 2010. Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGKbeta in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS One* 5(7): e11602.
- Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M. 2017. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily regulate synapse formation, maintenance, and function. *trends. Neurosci* 40(5): 295–308.
- Tabet R, Moutin E, Becker JA, *et al.* 2016a. Fragile X mental retardation protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(26): E3619–3628.
- Tabet R, Vitale N, Moine H. 2016b. Fragile X syndrome: are signaling lipids the missing culprits? *Biochimie* 130: 188–194.
- Tanguy E, Carmon O, Wang Q, Jeandel L, Chasserot-Golaz S, Montero-Hadjadje M, Vitale N. 2016. Lipids implicated in the

- journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J Neurochem* 137(6): 904–912.
- Tanguy E, Wang Q, Vitale N. 2018. Role of phospholipase D-derived phosphatidic acid in regulated exocytosis and neurological disease. *Handb Exp Pharmacol.* (in press).
- Tolias KF, Couvillon AD, Cantley LC, Carpenter CL. 1998. Characterization of a Rac1-and RhoGDI-associated lipid kinase signaling complex. *Mol Cell Biol* 18(2): 76270.
- Vitale N. 2010. Synthesis of fusogenic lipids through activation of phospholipase D1 by GTPases and the kinase RSK2 is required for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 38(1): 167–171.
- Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, *et al.* 2001. Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20(10): 2424–2434.
- Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bader MF. 2002. Regulated secretion in chromaffin cells: an essential role for ARF6-regulated phospholipase D in the late stages of exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 971: 193–200.
- Waselle L, Gerona RR, Vitale N, Martin TF, Bader MF, Regazzi R. 2005. Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol Endocrinol* 19(12): 3097–3106.
- Williams JM, Pettitt TR, Powell W, *et al.* 2007. Antineutrophil cytoplasm antibody-stimulated neutrophil adhesion depends on diacylglycerol kinase-catalyzed phosphatidic acid formation. *J Am Soc Nephrol* 18(4): 1112–1120
- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, *et al.* 2007. Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* 282(30): 21746–21757.
- Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, *et al.* 2008. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(24): 8434–8439.

Cite this article as: Tanguy E, Wang Q, Bagneaux PCd, Fouillen L, Thahouly T, Ammar M-R, Vitale N. 2018. Different species of phosphatidic acid are produced during neuronal growth and neurosecretion. *OCL* 25(4): D408.

Review

Protein–Phospholipid Interaction Motifs: A Focus on Phosphatidic Acid

Emeline Tanguy, Nawal Kassas and Nicolas Vitale * 

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR3212 and Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; emeline.tanguy@etu.unistra.fr (E.T.); Nawal.Kassas@hotmail.com (N.K.)

* Correspondence: vitalen@inci-cnrs.unistra.fr; Tel.: +33-388-456-712

Received: 28 February 2018; Accepted: 16 April 2018; Published: 23 April 2018



Abstract: Cellular membranes are composed of thousands of different lipids usually maintained within a narrow range of concentrations. In addition to their well-known structural and metabolic roles, signaling functions for many lipids have also emerged over the last two decades. The latter largely depend on the ability of particular classes of lipids to interact specifically with a great variety of proteins and to regulate their localization and activity. Among these lipids, phosphatidic acid (PA) plays a unique role in a large repertoire of cellular activities, most likely in relation to its unique biophysical properties. However, until recently, only incomplete information was available to model the interaction between PA and its protein partners. The development of new liposome-based assays as well as molecular dynamic simulation are now providing novel information. We will review the different factors that have shown to modulate the capacity of PA to interact with specific domains in target proteins.

Keywords: interaction motif; lipid binding; membrane; phospholipase D; phosphatidic acid

1. Introduction

The creation of a cell membrane to isolate the intracellular cytoplasm from the extracellular medium represented a major event in evolution. The so-called plasma membrane plays a critical role as a selective barrier, preventing the free diffusion of numerous small molecules such as ions, nucleotides, and diverse other biomolecules. This lipid interface also allows cells to maintain homeostasis by preventing the diffusion of important compounds needed for cell survival. Moreover, proteins transiently attached to or more directly embedded in the plasma membrane perform many vital cellular functions, such as transportation of molecules or organelles, signaling, and membrane reorganization. The importance of this class of proteins can be deduced by their relative prominence, as they form up to 40% of all cell proteins [1]. Among the class of proteins transiently associated with membranes, we can identify interactions based either on transient surface interaction or, alternatively, through post-translational modifications such as addition of a lipid to amino acids, allowing membrane anchoring. Most of the important biological functions involving signaling activity, membrane traffic, and transport rely on these membrane-associated proteins through their ability to transiently shuttle at the interface between the cytosol and lipid bilayers [2]. Modulation of the activity of peripheral membrane proteins often occurs after conformational changes resulting from membrane binding [2,3]. Alternatively, interactions with specific classes of lipids have also been reported to modulate directly the activity of transmembrane proteins such as ion channels or enzymes involved in lipid metabolism [2,4]. Understanding the mechanisms by which these proteins recognize and bind to their lipid partners represents a real challenge that would provide insights into the function of these proteins and might also facilitate future development of drugs to treat various pathological conditions.

Phosphatidic acid (PA) is one of the simplest glycerophospholipids and is present in only very small amounts in membranes (usually around 1%). Nevertheless, PA plays a key structural role as a precursor of most glycerophospholipids and has also been proposed to act as an important player in the transmission, amplification, and regulation of a great number of intracellular signaling and cellular functions [5]. Chemically, PA is comprised of a glycerol backbone to which are attached, through esterification, two fatty acyl chains and a phosphate at positions 1, 2, and 3, respectively. The unique feature of PA compared to the other diacyl-glycerophospholipids is its phosphomonoester link to a small anionic phosphate headgroup. At the molecular level, PA can interact with various proteins to modulate their catalytic activity and/or their membrane association, including guanosine triphosphatases (GTPases), kinases, phosphatases, nucleotide-binding proteins, and phospholipases [6]. Although a handful of proteins that present the capacity to bind to PA have been described, at least in the minimal lipid-strip assay, specific properties underlying protein–PA binding are still poorly understood. The particular phosphomonoester headgroup of PA, positioned close to the headgroup-acyl chain interface, is most likely critical in the binding of peripheral and transmembrane proteins. In agreement with the physiological importance of PA–protein interactions, many proteins have evolved domains that are relatively specific in their binding to PA [7]. In this article, rather than discussing the biological impact of protein–PA interactions that have been reviewed elsewhere [5,7,8], we will discuss the different biophysical parameters both for PA and proteins that contribute to effective and selective protein–PA interaction.

2. Phosphatidic Acid-Binding Modules

Using different *in vitro* assays, PA has been shown to interact with or regulate at least 50 different partners present in most organisms ranging from yeasts and plants to mammals [8]. The identification of PA-binding domains (PABDs) within PA effectors has proven to be challenging because it is not always clear whether protein–lipid interactions are specific for PA or whether they reflect an overall affinity for negatively charged lipids. Nevertheless, the idea that a short stretch of positively charged residues represents a major feature related to PA binding is emerging [8]. In agreement with this model, point mutations of basic residues within PABDs have often been found to reduce PA binding [7]. The current model proposes that a well-defined PA-recognition structural motif is unlikely to exist, but that a combination of positively charged and surface-exposed hydrophobic residues is responsible for the interaction with PA (Figure 1A). It is also clear that in addition to the charged lysine and arginine, certain amino acid residues like histidine, serine, and tryptophan are often found in PABDs (Figure 1A), but their exact function remains elusive.

Recently, a growing number of PABDs fused to fluorescent proteins, such as green fluorescent protein (GFP), have been used as probes to image dynamics of PA pools in living cells or to gain insight into the localization and function of PA partners. For instance, probes derived from the PABD of the yeast sporulation protein Spo20p, and the mammalian proto-oncogene Raf1 kinase, are among the most widely used. Intriguingly, when fused to GFP and overexpressed in cells, different PABDs are often found in different subcellular compartments. For instance, the PABD of Spo20p (Spo20p–PABD) generally accumulates in the nucleus or at the plasma membrane in mammalian cells [9–11], whereas the PABD of the yeast protein Opi1p (Opi1p–PABD) has the capacity to shuttle between the endoplasmic reticulum (ER) and the nucleus [12]. The PABD of the mammalian protein PDE4A1 (PDE4A1–PABD) is often associated with the Golgi apparatus [13]. Recent work excluded cell-specific expression or protein–protein interactions as causes for this differential localization. On the contrary, some evidence suggests that these different PABDs sense different pools of PA, each within a particular specific environment [14]. Among the *in vitro* assays used to study PA–protein interactions, lipid overlays—whereby single lipids are spotted from organic solution onto membranes—are widely used as an initial approach to study protein–lipid interaction. However, lipid overlay fails to present lipids in a bona fide membrane bilayer structure, thus making it untrustworthy. This is especially the case for PA, since (i) its protein recognition motif has been postulated to be rather undefined,

and (ii) its head group moiety, unlike most phospholipids, is probably mostly buried within the hydrophilic region of the membrane. Therefore, for PA, liposome-binding assays mimicking the membrane bilayer environment are now more commonly used, as they allow us to replicate most membrane parameters, can provide complex lipid composition, and modulate several biophysical characteristics of bilayer membranes.

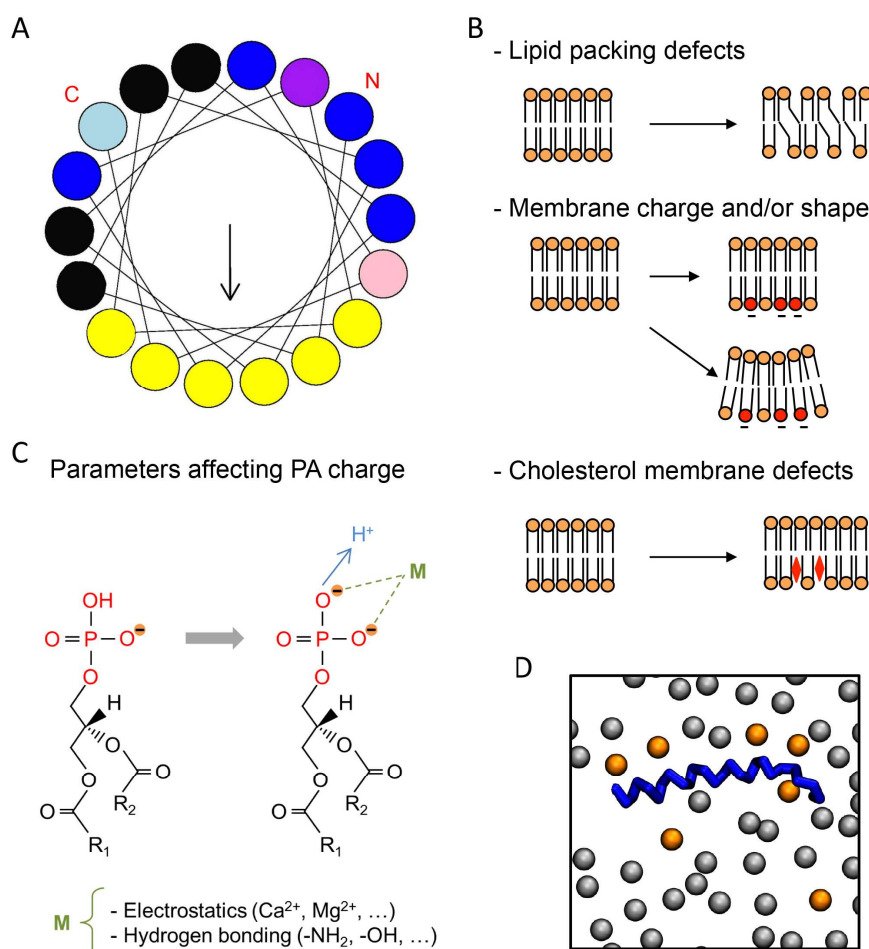


Figure 1. Typical phosphatidic acid (PA)-binding domain (PABD) and parameters affecting protein-PA interactions. **(A)** Amphipathic α -helix projection of a minimal characteristic PABD obtained with Heliquest software (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>). Arrow indicates hydrophobic moment. Critical basic and hydrophobic residues are indicated in blue and yellow, respectively. Histidine (light blue), tryptophan (pink), and serine (purple) residues are also often present in the PABD. The amino-terminal (N) and carboxyl-terminal (C) regions of the PABD are indicated. **(B)** Different parameters affecting protein-PA binding are indicated on the right, including, from top to bottom: lipid-packing defects caused by fatty acyl unsaturation, negatively charged phospholipids such as phosphatidylserine (PS) (red) and membrane curvature, and cholesterol membrane defects (red diamond). Note that any of these parameters can affect PA binding either individually or in combination. Although cholesterol affects the hydrophobic core of the membrane or its hydrophilic interface, it is likely that the most important effect of cholesterol regarding the interaction of proteins with PA involves protein accessibility to hydrophilic headgroups of the membrane. **(C)** The net charge of PA is also modulated by different parameters such as ionic concentration and pH (adapted from [15]). The fatty acyl chain length and degree of unsaturation in the sn-1 or sn-2 positions (R_1 and R_2) also modify the binding to PABDs. **(D)** Top view of the final shot of a molecular dynamics simulation (500 ns) of the PABD of Spo20p (blue) in a phosphatidylcholine (PC)/PA (grey/orange) artificial membrane [16]. Only the phosphate headgroups of the lipids of a single bilayer are shown.

3. Effect of Membrane Topology and Environment on Phosphatidic Acid Binding

Several groups have recently shown that the ability of PABDs to bind PA is strongly affected by membrane lipid composition. Among the different factors that define the biophysical properties of membrane bilayers, membrane packing is important for protein–lipid interactions. Indeed, lipid composition in general, and the degree of unsaturation of the fatty acyl chain in phospholipids in particular, produces small defects in the geometrical arrangement of lipids. In other words, the generation of small spaces between the lipid head groups is proposed to favor the binding of certain peripheral proteins (Figure 1B). Indeed, it is presumed that small differences in the overall shape of cylindrical phospholipids caused by unsaturated fatty acids in the sn-2 position could create surface cavities that would favor insertion of polypeptides usually harboring an α -helical conformation. It is important to remember that most, if not all, PA-binding modules share an amphipathic α -helix with positively charged amino acids on one side and hydrophobic residues on the other (Figure 1A). In line with this observation, a point mutation altering the α -helix of Spo20p was shown to reduce PA binding [9,10]. Using the PABDs of the yeast proteins Spo20p and Opi1p and the mammalian protein PDE4A1, in a fluorescence-based liposome assay, we have recently shown that although the three PABDs are sensitive to global packing defects, the latter two are more sensitive than Spo20p–PABD [14]. In line with increased binding of these sensors to PA when PA headgroups are more freely available, we also found that reducing liposome diameter, thereby increasing curvature, also increased PABD binding [14]. Using a different liposome-based assay, the Kooijman group made similar observations testing a larger set of PABDs [17]. These findings may be correlated to specific differences found in terms of packing defects and spontaneous curvature of membranes within the diverse intracellular organelles, and the specific subcellular distribution of these PABDs when expressed as PA sensors fused to GFP [14].

Like phosphatidylcholine (PC), the phospholipid phosphatidylethanolamine (PE) is also zwitterionic, but contains a much smaller headgroup, both in terms of actual size and hydration, and as such is supposed to reduce headgroup packing. As a consequence, PE was initially postulated to facilitate protein binding to membrane in general via increased insertion of amphipathic protein domains into lipid membranes [18]. However, in addition to these small changes in the global packing of membranes, PE also modulates the charge of phosphomonoester-containing membrane lipids. Indeed, it was shown that the interaction of the PA phosphomonoester headgroup with the primary amine in the headgroup of PE causes an increase in the negative charge of the phosphate ([18] and see below). In summary, PE has potentially two distinct effects on membranes that could influence protein–PA binding: (i) creating negative curvature stress and (ii) increasing the negative charge of PA from -1 to -2 via the electrostatic–hydrogen bond switch mechanism. In agreement with the idea that these two parameters are important for protein binding to PA, PE generally facilitates PA binding when included in liposomes [17]. Furthermore, when charges were kept constant but positive curvature was created by simultaneous insertion of lysophosphatidylcholine (LPC), PE was less effective at promoting PA binding, highlighting the importance of membrane curvature stress for proteins to bind PA [17].

Changing cholesterol levels is another way to modulate lipid packing in membranes (Figure 1B), reflecting the diversity of biological membranes where cholesterol levels increase along the secretory pathway from low levels in the ER to high levels at the plasma membrane. We have found that higher levels of cholesterol enhance the binding of PA-containing liposomes to Spo20p–PABD and less so to PDE4A1–PABD [14]. On the contrary, PA binding to Opi1p–PABD was negatively affected by cholesterol [14]. Altogether, these findings indicate that local membrane topology has a profound effect on PA binding for proteins, and moreover that PABDs display differential sensitivity to this parameter.

4. Effect of Membrane Charge on Phosphatidic Acid Binding

One of the most significant determining factors for biomembrane structure and function is the presence of negative charges. In agreement, it is well recognized that the negative charges carried by

anionic lipids in most biological membranes represent critical sites of attraction for positively charged (carrying basic amino acids) protein domains (Figure 1B). In liposome reconstitution assays, as in cellular membranes, the effects of electrostatic interaction can be quite effective, and they therefore represent useful assays to investigate the effect of this aspect on PA–protein interaction. When binding to lipids occurs through a cryptic stretch of basic amino acids, which like Velcro binds strongly beyond a certain level of negative charges, supplementary negative charges provided by other anionic lipids could also promote protein–lipid interactions. To directly test the action of the net charge on the capacity of distinct PABDs to bind to PA, increasing amounts of phosphatidylserine (PS) were added to the liposomes. This resulted in increasing charge in PA-containing liposomes and gradually enhanced binding to Spo20p–PABD [14,19] and PDE4A1–PABD [14], without significant modification in binding to Opi1p–PABD [14], once again revealing that various PABDs respond differently to this parameter. Rather intriguingly, different members of the Lipin PA-phosphatase family bind PA with varying affinity, probably because the number and specific arrangement of positive amino acids within their PABDs are quite different. It is therefore possible that different isoforms of Lipin present different sensitivities to the overall charge in membranes. Furthermore, the ability of Lipin-1 to bind PA also appears to be sensitive to phosphorylation, which is not the case for Lipin-3 [20]. The latter observation suggests that phosphorylation within or in proximity to the PABD could represent another mechanism by which PA binding is regulated.

Divalent ions such as calcium can also interact electrostatically with the negative charge formed by proton dissociation, hence altering the proton dissociation equilibrium and in consequence directly affect the amount of negative charges available for interaction (Figure 1C). Checking their action represents another way to probe the existence of physiologically relevant mechanisms to modulate protein–PA binding [21]. Micromolar concentrations of free calcium increase binding of Spo20p–PABD and PDE4A1–PABD to PA-containing liposomes. On the contrary, at physiological concentrations, calcium did not affect PA binding to Opi1p–PABD [14], in agreement with differences in calcium sensitivity between the different PABDs. The effect of membrane charge on protein–PA interaction can be summarized as follows: charge increase promotes electrostatic attraction between cationic amino acids in proteins containing PABD and thereby strengthens binding. In agreement with this model, computational analysis revealed that the electrostatic–hydrogen bond switch mechanism notably intensifies the affinity of PABDs for PA (Figure 1B) [22]. In agreement with these findings, it was observed both experimentally and by modeling simulations that divalent cations such as calcium can regulate the charge of PA [15,23].

5. Effect of Phosphatidic Acid Fatty Acyl Chain Composition

Mass spectrometry analysis showed that more than 40 different PA species are found in individual cell types [14,24], raising the possibility that these different forms of PA may have different biological functions. As a consequence, one could postulate that these different PA species display target specificity for the different PABDs. Probing this hypothesis, we recently tested in a liposome-binding assay the interaction of three PABDs, and found that the PABD of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 display a global predilection for long and unsaturated fatty acids [14]. Furthermore, although modest, preferences for the relative binding to different PA species were also observed among these PABDs. This was especially the case regarding the length of the sn-1 fatty acyl chain and the unsaturation status of the sn-2 chain [14]. Using molecular dynamics simulation, Spo20p–PABD was predicted to embrace an interfacial orientation displaying a large portion of hydrophobic amino acids embedded in the membrane, presumably interacting with fatty acids through hydrogen bonds [16]. One possible interpretation for differences found in PABD binding regarding unsaturation of PA may rely on the diverse composition in hydrophobic residues that vary from five to seven in the hydrophobic face of the three PABDs tested [14]. It must be pointed out that the number of positive charges also varies between PABDs, suggesting that the number of PA molecules that interact directly with one PABD is variable. This number can be as high as six for Spo20p (Figure 1D) [16]. As binding to PA by

these short PABD polypeptides does not require a proper core-structured domain, it is more likely that hydrophobic insertion into membranes, together with direct ionic interaction between positively charged amino acids and more than a few PA molecules, is responsible. Thus, a strict specificity for each PA form is not to be expected, as is the case for the distinct phosphoinositides [25]. A similar organization was recently proposed for the PABD of the cell death-inducing DFF45-like effector A (CIDEA), which facilitates embedding into the phospholipid monolayer of lipid droplets through its ability to bind PA [26]. On the other hand, the PABD of GTPase dynamin-related protein 1 (Drp1) presents a clear preference for PA with saturated fatty acids, independently of their contribution to membrane curvature or lipid packing, suggesting a direct interaction of the PABD of Drp1 and fatty acids of PA [27,28].

6. Effect of pH on Phosphatidic Acid Binding

In a theoretical membrane bilayer model made of the zwitterionic lipid PC associated with a marginal amount of PA molecules, it was found that the degree of deprotonation of PA might be changed during protein binding, therefore improving the protein adsorption free energy. This phenomenon could be directly affected by pH. By investigating if the electrostatic–hydrogen bond switch process directly affects PA–PABD binding through non-electrostatic interactions via the hydrogen potential, the May group found that this was indeed the case [22]. From these pilot studies, it was postulated that the electrostatic–hydrogen bond switch participates in mechanisms that allow proteins to differentiate PA within a membrane containing higher amounts of other anionic lipids such as PS [22]. Despite many approximations in the model used, this work suggests the existence of an additional non-electrostatic contribution to binding, further increasing the sensitivity of this pH dependence. Consequently, the affinity of PABDs for membranes can drop dramatically after a physiological decrease in pH. In total agreement with modulation of PA–protein interactions by pH, as proposed by the electrostatic–hydrogen bond switch model, the Loewen group showed that the negative transcriptional regulator Opi1p regulates PA binding in a pH-sensitive manner, as a consequence of membrane biogenesis and general metabolism in yeast [29]. Starvation induces a drop in cytosolic pH in yeast and, consequently, Opi1p is released from the ER membrane and shuttles to the nucleus where it modulates gene expression, leading to membrane biogenesis shutdown. Conversely, in normal growth conditions where pH is neutral, Opi1p is restricted to the ER membrane, permitting membrane biogenesis. Thus, nutrient depletion effectively shuts down growth through a process that involves an on-and-off Opi1–PA dependent recruitment to the ER, in line with the idea that PA acts as a pH sensor. For the moment, there is no homologue of Opi1 in mammals, and it is not known if this pH regulation of protein–PA binding occurs for other PA targets. However, nuclear magnetic resonance and molecular dynamics simulations revealed that the PABD of the protein Dishevelled (Dvl) also binds PA in a pH-sensitive manner, therefore modulating its ability to interact with the Frizzled receptor and the plasma membrane [30].

7. Conclusions

This review highlights the current requirements for in-depth study of lipid–protein interactions, taking into consideration the comprehensive physical chemistry of individual membrane lipids, such as PA, in the context of a global membrane bilayer. The recent literature, based on experimental and computational evidence, supports the notion that the electrostatic–hydrogen bond switch in the phosphate headgroup of PA associated with positioning of the phosphate headgroup in close proximity to the hydrophobic interior of the membrane confers unique properties to PA, in comparison with other anionic membrane lipids. The data currently available establish that curvature stress and local lipid composition in the membrane, together with the particular biophysical properties of PA, are important factors in the binding characteristics of PABDs (Figure 1B,C). A minimalist theoretical model called the electrostatic–hydrogen bond switch model, largely based on the unique ionization properties of the phosphomonoester of PA, proposes that the initial membrane interaction of a cytosolic PABD

is electrostatic in nature. This initial interaction could allow sampling of the local environment to differentiate PA from the other anionic lipids such as PS. After PA–protein interaction via hydrogen bonds between basic residues in binding domains, and potentially between hydrophobic residues and PA fatty acyl chains, PABDs change from a lightly bound to a docked state on the membrane. During this progression, the ionization of PA can switch from -1 to -2 , further anchoring the PABD to the membrane [20]. Our own calculation estimated that the K_d of PA for the PABD of Spo20p, Opi1p, and PDE4A1 is in the micromolar range [14], in agreement with moderate affinity binding. However, the progressive α -helical organization, together with evidence from dynamic modelization suggesting that different PABDs could associate with more than one PA molecule, could significantly affect these numbers. It must be kept in mind that PA binding differentially affects protein activity. In some cases, PA increases membrane translocation or residency, whereas, in other cases, enzymatic activity could be directly modulated. These considerations reflect the large amount of work that lies ahead of us to fully understand the many biological functions of the simplest glycerophospholipid. Finally, binding of basic amino acids to the headgroup of PA, likely together with the probable contribution of hydrophobic forces and membrane geometry, provides an important mode of PA–protein interaction, as described in this review. However, this model is clearly not limited to amino acid–lipid interactions, as additional molecules such as small molecule inhibitors have also been shown to be effective for PA binding [31].

Acknowledgments: This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer and from Fondation pour la Recherche Médicale to N.V. We thank David. Hicks for critical reading of the manuscript.

Author Contributions: E.T., N.K. and N.V. wrote the manuscript. N.V. revised the manuscript.

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

References

1. Arora, A.; Tamm, L.K. Biophysical approaches to membrane protein structure determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 540–547. [[CrossRef](#)]
2. Basso, L.G.M.; Mendes, L.F.S.; Costa-Filho, A.J. The two sides of a lipid-protein story. *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 179–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Shenoy, S.; Shekhar, P.; Heinrich, F.; Daou, M.; Gericke, A.; Ross, A.H.; Lösche, M. Membrane association of the PTEN tumor suppressor: Molecular details of the protein–membrane complex from SPR binding studies and neutron reflection. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Raja, M.; Spelbrink, R.E.J.; de Kruijff, B.; Killian, J.A. Phosphatidic acid plays a special role in stabilizing and folding of the tetrameric potassium channel KcsA. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 5715–5722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ammar, M.R.; Kassas, N.; Bader, M.F.; Vitale, N. Phosphatidic acid in neuronal development: A node for membrane and cytoskeleton rearrangements. *Biochimie* **2014**, *107*, 51–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ammar, M.R.; Kassas, N.; Chasserot-Golaz, S.; Bader, M.F.; Vitale, N. Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Front. Endocrinol.* **2013**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Stace, C.L.; Ktistakis, N.T. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2006**, *1761*, 913–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jang, J.H.; Lee, C.S.; Hwang, D.; Ryu, S.H. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 71–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Nakanishi, H.; de los Santos, P.; Neiman, A.M. Positive and negative regulation of a SNARE protein by control of intracellular localization. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 1802–1815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Zeniou-Meyer, M.; Zabari, N.; Ashery, U.; Chasserot-Golaz, S.; Haeberlé, A.M.; Demais, V.; Bailly, Y.; Gottfried, I.; Nakanishi, H.; Neiman, A.M.; et al. Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21746–21757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kassas, N.; Tryoen-Tóth, P.; Corrotte, M.; Thahouly, T.; Bader, M.F.; Grant, N.J.; Vitale, N. Genetically encoded probes for phosphatidic acid. *Methods Cell Biol.* **2012**, *108*, 445–459. [[PubMed](#)]

12. Loewen, C.J.; Gaspar, M.L.; Jesch, S.A.; Delon, C.; Ktistakis, N.T.; Henry, S.A.; Levine, T.P. Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* **2004**, *304*, 1644–1647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Baillie, G.S.; Huston, E.; Scotland, G.; Hodgkin, M.; Gall, I.; Peden, A.H.; MacKenzie, C.; Houslay, E.S.; Currie, R.; Pettitt, T.R.; et al. TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca²⁺-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28298–28309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kassas, N.; Tanguy, E.; Thahouly, T.; Fouillen, L.; Heintz, D.; Chasserot-Golaz, S.; Bader, M.F.; Grant, N.J.; Vitale, N. Comparative Characterization of Phosphatidic Acid Sensors and Their Localization during Frustrated Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 4266–4279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wang, W.; Anderson, N.A.; Travesset, A.; Vaknin, D. Regulation of the electric charge in phosphatidic acid domains. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 7213–7220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Potocký, M.; Pleskot, R.; Pejchar, P.; Vitale, N.; Kost, B.; Zárský, V. Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. *New Phytol.* **2014**, *203*, 483–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Putta, P.; Rankenberg, J.; Korver, R.A.; van Wijk, R.; Munnik, T.; Testerink, C.; Kooijman, E.E. Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858*, 2709–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. McIntosh, T.J. Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *81*, 117–131. [[CrossRef](#)]
19. Horchani, H.; de Saint-Jean, M.; Barelli, H.; Antonny, B. Interaction of the Spo20 membrane-sensor motif with phosphatidic acid and other anionic lipids, and influence of the membrane environment. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Boroda, S.; Takkellapati, S.; Lawrence, R.T.; Entwisle, S.W.; Pearson, J.M.; Granade, M.E.; Mullins, G.R.; Eaton, J.M.; Villén, J.; Harris, T.E. The phosphatidic acid-binding, polybasic domain is responsible for the differences in the phosphoregulation of lipins 1 and 3. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 20481–20493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kooijman, E.E.; Carter, K.M.; van Laar, E.G.; Chupin, V.; Burger, K.N.; de Kruijff, B. What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry* **2005**, *44*, 17007–17015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Loew, S.; Kooijman, E.E.; May, S. Increased pH-sensitivity of protein binding to lipid membranes through the electrostatic-hydrogen bond switch. *Chem. Phys. Lipids* **2013**, *169*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Faraudo, J.; Travesset, A. Phosphatidic acid domains in membranes: Effect of divalent counterions. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2806–2818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Andreyev, A.Y.; Fahy, E.; Guan, Z.; Kelly, S.; Li, X.; McDonald, J.G.; Milne, S.; Myers, D.; Park, H.; Ryan, A.; et al. Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2785–2797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hammond, G.R.; Balla, T. Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*, 746–758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Barneda, D.; Planas-Iglesias, J.; Gaspar, M.L.; Mohammadyani, D.; Prasanna, S.; Dormann, D.; Han, G.S.; Jesch, S.A.; Carman, G.M.; Kagan, V.; et al. The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. *Elife* **2015**, *26*, e07485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Adachi, Y.; Itoh, K.; Yamada, T.; Cervený, K.L.; Suzuki, T.L.; Macdonald, P.; Frohman, M.A.; Ramachandran, R.; Iijima, M.; Sesaki, H. Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division. *Mol. Cell* **2016**, *63*, 1034–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Adachi, Y.; Iijima, M.; Sesaki, H. An unstructured loop that is critical for interactions of the stalk domain of Drp1 with saturated phosphatidic acid. *Small GTPases* **2017**, *23*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Young, B.P.; Shin, J.J.; Orij, R.; Chao, J.T.; Li, S.C.; Guan, X.L.; Khong, A.; Jan, E.; Wenk, M.R.; Prinz, W.A.; et al. Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science* **2010**, *329*, 1085–1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

30. Capelluto, D.G.; Zhao, X.; Lucas, A.; Lemkul, J.A.; Xiao, S.; Fu, X.; Sun, F.; Bevan, D.R.; Finkielstein, C.V. Biophysical and molecular-dynamics studies of phosphatidic acid binding by the Dvl-2 DEP domain. *Biophys J.* **2014**, *106*, 1101–1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Parry, M.J.; Alakoskela, J.M.; Khandelia, H.; Kumar, S.A.; Jaattela, M.; Mahalka, A.K.; Kinnunen, P.K. High-affinity small molecule-phospholipid complex formation: Binding of siramesine to phosphatidic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12953–12960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology

Emeline Tanguy¹, Qili Wang¹, Hervé Moine² and Nicolas Vitale^{1*}

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, Strasbourg, France, ²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR 7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

Among the cellular lipids, phosphatidic acid (PA) is a peculiar one as it is at the same time a key building block of phospholipid synthesis and a major lipid second messenger conveying signaling information. The latter is thought to largely occur through the ability of PA to recruit and/or activate specific proteins in restricted compartments and within those only at defined submembrane areas. Furthermore, with its cone-shaped geometry PA locally changes membrane topology and may thus be a key player in membrane trafficking events, especially in membrane fusion and fission steps, where lipid remodeling is believed to be crucial. These pleiotropic cellular functions of PA, including phospholipid synthesis and homeostasis together with important signaling activity, imply that perturbations of PA metabolism could lead to serious pathological conditions. In this mini-review article, after outlining the main cellular functions of PA, we highlight the different neurological diseases that could, at least in part, be attributed to an alteration in PA synthesis and/or catabolism.

OPEN ACCESS

Edited by:

Gabriela Alejandra Salvador,
Universidad Nacional del Sur,
Argentina

Reviewed by:

Richard M. Eppard,
McMaster University, Canada
Daniel M. Raben,
Johns Hopkins University,
United States

*Correspondence:

Nicolas Vitale
vitalen@unistra.fr

Received: 22 October 2018

Accepted: 07 January 2019

Published: 23 January 2019

Citation:

Tanguy E, Wang Q, Moine H and Vitale N (2019) Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology. *Front. Cell. Neurosci.* 13:2. doi: 10.3389/fncel.2019.00002

Keywords: lipid signaling, neuron, neuropathology, phosphatidic acid, phospholipase D

INTRODUCTION

Phosphatidic acid (PA) is a low abundant phospholipid of membranes that, nevertheless, constitutes the original building block from which most glycerophospholipids are synthesized, thus plays an important structural task. Interestingly it was later shown that PA also acts to transmit, amplify, and regulate a great number of intracellular signaling pathways and cellular functions. In cells, PA can be synthesized through different enzymatic pathways (Ammar et al., 2014). Structural PA results from two successive acylation reactions (**Figure 1**). Signaling PA instead, results from three biosynthesis alternative pathways. The first pathway includes the phosphorylation of diacylglycerol (DAG) by any of the 10 DAG-kinases (DGKs) in mammals (**Figure 1**). Hydrolysis of the distal phosphodiester bond in phospholipids by phospholipases D (PLD) constitutes the second pathway (**Figure 1**). Although six different PLDs have been identified in mammals, only PLD1/2 and PLD6 have been shown to synthesize PA from phosphatidylcholine (PC) and cardiolipin (CL), respectively (Jang et al., 2012). The third and final biosynthetic pathway involves acylation of lyso-PA by lyso-PA-acyltransferase (LPAAT) enzymes (**Figure 1**).

Chemically, PA is composed of a glycerol backbone esterified with two fatty acyl chains at positions C-1 and C-2, and with a phosphate at position C-3. The latter confers the specific features of PA compared to the other diacyl-glycerophospholipids. Indeed, the small anionic phosphate headgroup provides to PA a combination of unique cone-shaped geometry and negative charge (Jenkins and Frohman, 2005). At the molecular level, these two characteristics enable PA both to

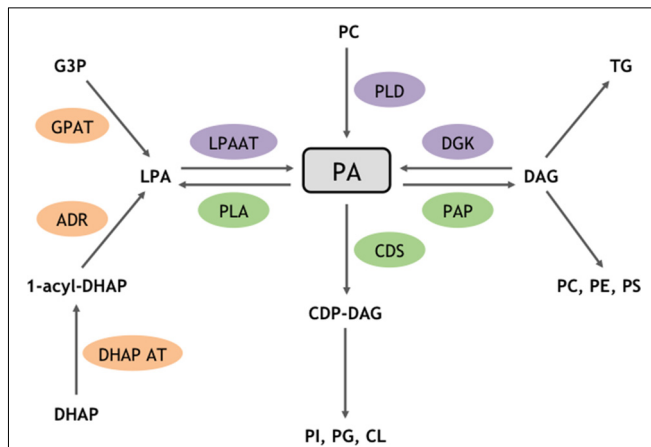


FIGURE 1 | Enzymatic routes for structural and signaling PA metabolism. PA is a major phospholipid for biosynthetic and signaling reactions. Enzymes highlighted in orange are involved in biosynthetic reactions that produce structural PA, whereas enzymes triggering the formation of signaling pools of PA are shown in purple. Enzymes responsible for PA catabolism are shown in green. ADR, Acylidihydroxyacetone-phosphate reductase; CDP, cytidyl phosphatidate; CDS, CDP-diacylglycerol (DAG) synthase; CL, cardiolipin; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; DHAP AT, dihydroxyacétone phosphate acyltransferase; G3P, glycerol 3-phosphate; GPAT, glycerol phosphate acyltransferase; PAP, phosphatidic acid phosphatase; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PLA, phospholipase A; TG, triglyceride.

interact with different enzymes to regulate their catalytic activity and/or their association with membrane compartments and also to affect membrane geometry by creating local negative curvatures (Kooijman et al., 2003). As a consequence, PA has been involved in various important cellular functions including membrane trafficking events where membrane rearrangements are necessary (Bader and Vitale, 2009). In this article, we will present some of the most studied PA identified partners, summarize the most well-described cellular processes that require PA and discuss the potential involvement of an alteration in PA synthesis and/or catabolism in different neurological diseases.

PA INTERACTS WITH AND RECRUITS NUMEROUS PROTEINS TO MEMBRANES

Having an overall view of the interaction network of a given molecule is particularly helpful for deciphering the relationships between the constituents of interactomes and characterizing their function in cell signaling. Since the early description of a handful of proteins that bind to PA, at least using the minimal *in vitro* protein-lipid overlay assay, an extensive list of PA interactors has only emerged more recently (Stace and Ktistakis, 2006). For at least some of those, their interaction with PA appears rather specific with little or no interaction with other negatively charged lipids. The position of PA's phosphomonoester headgroup in proximity of the interface of acyl chain headgroup was proposed to be important for binding

to specific proteins. Supporting the physiological importance of interactions between PA and proteins, numerous proteins have gained domains that display some level of binding specificity for PA (Jang et al., 2012). Although no clear PA-binding domain can be defined at the three dimensional or secondary structural levels, different factors can influence PA interaction with specific domains in target proteins (Tanguy et al., 2018). For instance, we and others have found that some PA-binding modules possess some levels of specificity for the fatty acyl chains of PA (Kassas et al., 2017). In addition, the local membrane environment surrounding PA also appears to modulate PA binding to these modules (Kassas et al., 2017). Finally, it is most likely that PA-binding domains act first through positively charged residues that initially sample for the negative charge of PA buried within the membrane. This first step is probably followed by a docking state where hydrophobic interaction between hydrophobic residues of the module and the fatty acyl chains of PA stabilize the PA-protein interaction (Potocký et al., 2014; Tanguy et al., 2018). At present, more than 50 different proteins have been shown to directly interact with PA, as extensively reviewed in Jang et al. (2012). Briefly, these PA interactors can be classified in four major families.

Nucleotide-Binding Proteins

Nucleotide (ATP, cAMP, GTP)-binding proteins are important signaling proteins for which the activity is usually regulated by nucleotide binding. Noticeably, the localization and/or activity of many of those proteins are also controlled by PA interaction. This is for instance the case for some of the small GTP-binding proteins of the ADP ribosylation factor (Arf) and Rho (Ras homologous) families that are key players in cytoskeleton remodeling and membrane dynamics. The minimal PA-binding regions of these small GTPases remains however to be defined precisely. Several c-AMP specific phosphodiesterases also interact with PA through their amino-terminal regulatory domains leading to an increase of their enzymatic activity and therefore to a reduction of cAMP levels.

Regulators of GTP-Binding Proteins

The GTPase-activating proteins ArfGAP with GTPase Domain, Ankyrin Repeat and PH domain 1 (AGAP1) and Regulator of G protein Signaling 4 (RGS4) are negative regulators of Arf and Gα GTP-binding proteins, respectively. Intriguingly, while PA stimulates the GTP-hydrolysis activity of AGAP1, it inhibits that of RGS4, highlighting the multiple and sometimes opposite actions of PA on GTP-binding activity. Furthermore, PA has also been shown to recruit and activate different guanine nucleotide-exchange proteins for small GTPases, such as DedicatOr of CytoKinesis 2 (DOCK2) and Son Of Sevenless (SOS), promoting GTP-binding and activation of Rac and Ras, respectively. It is therefore important to have in mind that PA enrichment in particular sub-membrane domains could influence in different and sometimes contradictory manners a given signaling pathway involving GTP-binding proteins by acting at different stages.

Kinases

Protein kinases are among the main signaling regulators with nearly 600 different genes. Among those, protein kinase C (PKC) is one of the largest subgroup and PA modulates the activity of several PKC isoforms. PA also promotes recruitment and activation of the proto-oncogene kinase Raf, acting as a gatekeeper in the ERK1/2 pathway. In addition, PA binding to the FKBP12-rapamycin binding region of mTOR is in competition with FKBP12/rapamycin complex of mTOR and is thus likely to influence nutrient sensing and cell proliferation.

Furthermore, lipid kinases contribute to the great diversity of lipids in cells. Among those, PA is capable to stimulate the action of phosphatidylinositol (PI) 4-phosphate 5-kinase (PI4P5K), to promote the synthesis of PI 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), a key signaling lipid (Stace and Ktistakis, 2006; Bader and Vitale, 2009). Finally, cytosolic sphingosine kinase that transforms sphingosine into sphingosine-phosphate appears to translocate to the plasma membrane under the control of PA levels, which most likely affects the signaling pathways involving these two lipids. In conclusion, PA binding modules are found in members of the two major kinase families and consequently, the presence of PA in local membrane composition is expected to influence crucial signaling nodes and the various associated key cellular functions.

Phosphatases

In addition to kinases, phosphatases constitute the second important family of signaling proteins that modulate protein activity by removing the phosphate residues added by kinases. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 that negatively modulates signaling pathways involving receptor-tyrosine kinase directly interacts with PA therefore triggering phosphatase activity. Furthermore, PA inhibits the enzymatic activity of protein phosphatase 1 (PP1), involved in many cellular activities such as the metabolism of glycogen, the processing of RNA, and the regulation of cell cycle. In conclusion, although not as well described as for kinases, the regulation of several phosphatases by PA offers the possibility of complex and often paradoxical regulation of signaling pathway by a single lipid family.

THE PLEIOTROPIC CELLULAR FUNCTIONS OF PA

Actin Cytoskeleton Dynamics

Most cellular functions are influenced by precise cell shapes that are under the control of the cytoskeleton proteins network. Among those the dynamics of the cytoskeleton depends on the formation of actin filaments from a pool of cytosolic monomers, and their subsequent association to each other or to cell membranes, pursued by their depolymerization. Most cellular functions actually depend on a permanent remodeling of this actin network and this is orchestrated in large part by actin binding proteins. Interestingly lipids such as phosphoinositides modulate the affinity of these proteins for actin. PA, however, has also been proposed to participate to this regulation (Ammar et al., 2014).

In neurons, the Rho GTPases and related proteins, through the control of the cytoskeleton, modulate various aspects of cell

shape including not only neurite outgrowth and differentiation, axonal growth and targeting, but also dendritic spine formation and maintenance (Ammar et al., 2014). As mentioned in the sections “Nucleotide-Binding Proteins” and “Regulators of GTP-Binding Proteins,” PA synthesized by either PLD or DGK modulates the activity of some different Rho family of GTPases and their regulators by promoting membrane association and/or through the activation of their regulatory proteins (Chae et al., 2008; Nishikimi et al., 2009; Faugaret et al., 2011; Kurooka et al., 2011; Sanematsu et al., 2013). Alternatively, the p21 activated kinases (PAKs) family that regulates various aspects of neuronal development, through actin cytoskeleton reorganization, is also known for being activated by PA (Daniels et al., 1998; Hayashi et al., 2007). Furthermore, PI(4,5)P₂ is a major lipid regulator of the cytoskeleton and PA is an essential building block leading to PI(4,5)P₂ synthesis (Figure 1). In an alternative pathway, PA stimulates the phospholipid kinase PI4P5K, leading to the phosphorylation of the membrane phospholipid PI(4)P and the formation of PI(4,5)P₂ (Honda et al., 1999). In consequence, PA potentially regulates the activity of the three mammalian PI4P5K isozymes that have been described to control actin cytoskeleton reorganization (van den Bout and Divecha, 2009; Roach et al., 2012). Finally, PA levels regulate membrane localization and activity of PKC isoforms α , ϵ and ζ , all of which are known to affect the morphology of the actin cytoskeleton (Jose Lopez-Andreo et al., 2003).

It is also worth noting that direct interaction of PA with actin-binding proteins has been suggested. Among those potential candidates, the actin-binding protein vinculin known to be involved in neurite outgrowth is a good example (Ito et al., 1982; Johnson and Craig, 1995), but the specificity of these observations remains to be firmly established, since vinculin also binds to other negatively charged lipids, such as PI(4,5)P₂.

Membrane Remodeling Events

The secretory pathways have evolved through the establishment of specialized subcellular compartments dedicated to specific biochemical tasks. Membrane trafficking events between these compartments enable particular cells of complex organisms to secrete informative molecules such as hormones, cytokines, and neurotransmitters, for long distance inter-cellular communication. In addition to dedicated and specialized protein machineries, trafficking events of the regulated exocytosis and endocytosis steps also involve remarkable membrane rearrangements that rely on specific lipids (Ammar et al., 2013b). Hence, the first direct molecular data suggesting a role for PLD1-generated PA in hormone release were obtained in chromaffin cells, where overexpression of PLD1, injection of a catalytically-inactive PLD1 mutant (Vitale et al., 2001) or PLD1 silencing (Zeniou-Meyer et al., 2007) affected catecholamine release rates. Using similar approaches, PA synthesized by PLD1 was also shown to govern the regulated secretion of insulin from β -pancreatic cells (Waselle et al., 2005), of von Willebrand factor from endothelial cells (Disse et al., 2009), and acrosomal exocytosis from sperm cells (Lopez et al., 2012; Pelletán et al., 2015). An additional contribution for PA in secretion has been established during the early phase

of azurophilic granules release in neutrophils triggered by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (Williams et al., 2007). Ultimately, different enzymes controlling PA metabolism such as PLDs, LPAATs and DGKs have been proposed to regulate neurotransmission in several neuronal models, suggesting that PA regulates synaptic vesicle release and cycle (Humeau et al., 2001; Schwarz et al., 2011; Tabet et al., 2016a,b; Raben and Barber, 2017).

Intense membrane remodeling also occurs in specialized phagocytic cells, such as in macrophages. Indeed, the ingestion of pathogens, cell debris, or any other solid particle through the formation of phagosomes requires plasma membrane extension and either local lipid synthesis, transfer, or vesicular fusion. PA synthesis by PLD2 has been shown to be important for this early step of phagocytosis, while PA synthesis by PLD1 appears to be also important for the later step of phagosome maturation (Corrotte et al., 2006, 2010). Of note, PA transfer from the ER to plasma membrane during “frustrated phagocytosis,” a model where macrophages are plated on IgG-coated plates, has also been suggested to occur from experiments using a combination of lipidomic analysis performed on subcellular fractions and novel PA sensors (Kassas et al., 2017). Furthermore, PA is involved in the invasion and exit of infected cells by apicomplexan parasites (Bullen et al., 2016). It was shown that PA is required for the release of adhesins, perforins and proteases from specialized organelles from these parasites called micronemes (Bullen et al., 2016).

Additional intracellular trafficking events involving intense membrane remodeling have also been shown to require modification in PA levels. To cite only a few, we can also mention that PA critically regulates vesicle budding from the Golgi (Yang et al., 2008), autophagy (Holland et al., 2016), and exosome release (Ghossoub et al., 2014). The mechanisms by which PA promotes membrane rearrangements remain however an unsolved issue (Figure 2). The first proposed mode of action of PA in membrane remodeling may depend on its ability to induce membrane curvature and promote fusion, but its ability to specifically regulate the activity of different proteins involved in the vesicle docking and/or recruit crucial fusion proteins has also been proposed (Tanguy et al., 2016, 2018). In a simplified model for membrane fusion a mixture of lipids and proteins appear to be crucial at the fusion site (Tanguy et al., 2016). In principle the intrinsic negative curvatures of accumulating cone-shaped lipids, such as PA in the inner (cis) leaflets of contacting bilayers, should facilitate fusion of merging membranes. But it is worth noting that the promotion of membrane fusion through local modification of membrane curvature also appears to hold true for other cone-shaped lipids such as cholesterol and DAG (Tanguy et al., 2016). Reconstituted membrane fusion assays have been valuable to dissect the role of individual components and on this instance it is important to highlight that PA was observed playing a unique role among cone-shaped lipids in a yeast vacuole fusion assay, suggesting a more complex mode of action of this lipid (Mima and Wickner, 2009). Furthermore, PA could locally accumulate and form microdomains highly negatively charged, which potentially serve as membrane retention sites for

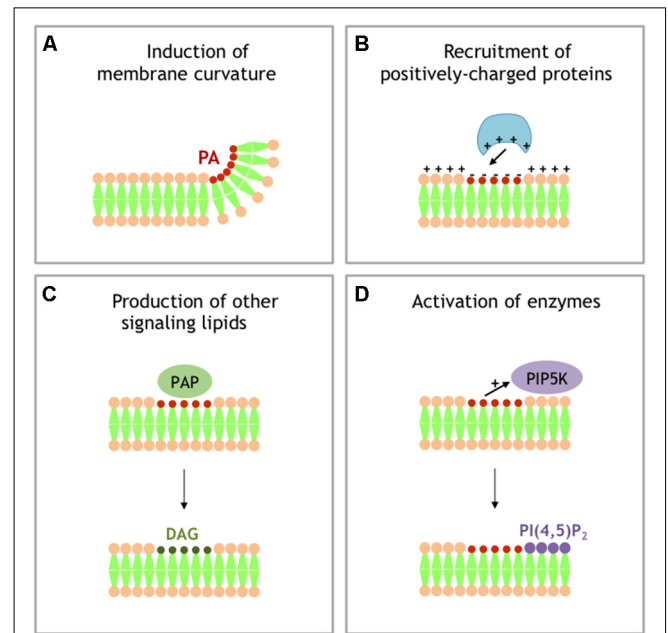


FIGURE 2 | Different models for signaling activity of PA. **(A)** Local accumulation of PA in a single leaflet of membrane generates negative membrane curvature. **(B)** Local accumulation of PA generates local buildup of negative charges that recruit PA effector-containing positively charged domains. **(C)** PAPs transforms PA into DAG, another signaling lipid with specific activity. **(D)** PA stimulates the activity of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PI4P5K), producing PI 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), an additional important signaling lipid.

several proteins key for exocytosis, such as the SNARE protein syntaxin-1 (Lam et al., 2008), or other membrane remodeling processes (Jenkins and Frohman, 2005). Finally, as a precursor for DAG and PI(4,5)P₂, both known to contribute to numerous membrane remodeling events, PA could also have indirect effects. All these potential contributions of PA in membrane fusion have been reviewed elsewhere (Chasserot-Golaz et al., 2010; Ammar et al., 2013b, 2014; Tanguy et al., 2016), but solving the issue of the mechanistic role of PA in a given membrane remodeling process requires probing these different scenarios (Figure 2), which is now in need for novel methods and tools.

Apoptosis, Survival, Growth, Proliferation and Migration

Many survival signals including hormones and growth factors activate PA synthesis through the stimulation of PLD activity. Similarly, mitogenic signals trigger cell proliferation, suppression of cell cycle arrest, and prevention of apoptosis. The PLD–PA–Rheb–mTOR and the PLD–PA–MAP kinase pathways are the two main downstream pathways of PLD involved in mitogenic signals and have been described extensively (Foster, 2009). Obviously, future solving of the complex imbrication of these pathways and understanding of the spatiotemporal relationships between PA-generating enzymes, PA-binding partners and PA itself will require development of more specific tools and extensive work.

NEUROLOGICAL DISORDERS POTENTIALLY LINKED TO AN ALTERATION OF PA LEVELS

In all organisms from yeast to mammals, PA was shown to possess signaling activity (Jenkins and Frohman, 2005) and a recent review highlights the apparent mystery of the many roles of PA in plants (Pokotylo et al., 2018). In addition, various PA-generating enzymes were shown to be involved in an increasing number of neuronal pathologies, suggesting a fundamental role of PA in the outcome of these neurodiseases (Tanguy et al., 2018). In the next chapter, we will describe four neuronal pathologies that may be the consequence, at least partially, of an alteration in PA dynamics.

Fetal Alcohol Spectrum Disorders

The damaging effects of alcohol drinking during gestation on the developing fetus are extremely well documented (Ehrhart et al., 2018). Fetal alcohol spectrum disorders (FASDs) is a generic term used to define the birth deficiencies that result from prenatal exposure to alcohol that range from mild to severe. These developmental defects on unborn infants have lifelong physical, behavioral, and cognitive disabilities. As alcohol consumption avoidance during pregnancy is in theory easy to achieve, FASD is in fact considered as one of the largest preventable forms of non-genetic birth disabilities associated with intellectual incapacity.

Although the main effort remains prevention of alcohol consumption during pregnancy, it is also important to understand the underlying pathological mechanisms involved in these effects of ethanol. In addition to the well-recognized ethanol and acetaldehyde toxicity, alcohol intensifies oxidative stress causing consequent effects such as DNA, protein and membrane damages. Additionally, it has been known for over three decades that in the presence of 1%–3% of ethanol, the two best characterized mammalian isoforms PLD1 and PLD2 catalyze a transphosphatidyl transfer reaction. In this case alcohol replaces water during PC hydrolysis, and phosphatidyl alcohols are formed at the expense of PA (Jenkins and Frohman, 2005). Thus, in presence of ethanol, phosphatidylethanol is synthesized while PA is not. Since it is likely that phosphatidylethanol cannot replace PA as a signaling molecule, this was used as a trick to “inhibit” PLD activity (actually prevent PA production), but also in assays to quantify PLD activity (Ammar et al., 2014). It was also shown that ethanol inhibits the mitogenic downstream actions of PA on neuron progenitors (Klein, 2005). Furthermore, it was recently shown that both PLD1 and PLD2 strongly contribute to astroglial proliferation induced by IGF-1 (Burkhardt et al., 2014). Therefore, the perturbation of the IGF1-PLD signaling pathway could, at least in part, explain the teratogenic effects of ethanol observed in FASDs.

Neurological Cancers

Glioblastoma is the most frequent and aggressive brain cancer, with an estimated incidence of near five novel cases per 100,000 persons every year in the USA and Europe. Nearly 200,000 persons die from glioblastoma every year worldwide.

It is a relatively difficult cancer to diagnose, as the symptoms are mainly non-specific, including headache and nausea, but leading to alterations of neurological functions such as speech, vision, behavior and memory. Like for many cancer tissues, elevated PLD activity was found in glioblastoma, suggesting that an increase in PA levels is a cause and/or consequence of the pathology (Park et al., 2009). At least part of the survival effect of increased PLD activity on glioblastoma appears to involve the Akt pathway (Bruntz et al., 2014). Interestingly, lipidomic analyses revealed that PA levels are altered in the regions that attract glioblastoma cells, indicating that PA levels control the homing process of glioblastoma (Wildburger et al., 2015). Undoubtedly, a better understanding of the multiple functions of PA in brain tumor development and progression may help to improve treatments and subsequently get a better prognosis for this aggressive cancer.

Intellectual Disability Diseases

Intellectual disability diseases are a common state defined by significant restriction in intellectual capacities and adaptive behavior that happen during childhood, with an overall intelligence quotient below 70 together with associated reduction in social, daily living and communication skills. These heterogeneous disease conditions affect 1%–3% of all populations and are thought to result from multiple causes, including environmental, chromosomal and monogenetic alterations. Among the several hundreds of genes involved, some affect brain development, neurogenesis, neuronal migration, or synaptic function (Humeau et al., 2009). Below we will briefly describe the data that support the notion of an alteration of PA levels and/or dynamics in the Fragile-X syndrome (FXS) and the Coffin-Lowry syndrome (CLS).

FXS is a neurodevelopmental pathology accountable for the most common inherited form of intellectual infirmity and autism spectrum disorder. It is generally the consequence of the hypermethylation of CGG expansion repeats (>200) in the 5' untranslated region of the *FMR1* gene leading to transcription silencing. In a recent study, we pointed DGK kinase- κ (DGK κ) mRNA as the foremost target of Fragile Mental Retardation Protein and found an alteration in PA synthesis in neurons cultured from *Fmr1*-knockout mice after group 1 metabotropic glutamate receptor (mGluRI) stimulation (Tabet et al., 2016a). Silencing DGK κ in CA1 pyramidal neurons modified the immature over mature spine ratio and like in the *Fmr1*-knockout mouse phenotype, reduced LTP and increased LTD (Tabet et al., 2016a). Moreover, the typical *Fmr1*-knockout mouse phenotype on dendritic spine morphology was restored back to normal after overexpression of DGK κ (Tabet et al., 2016a). Finally, DGK κ silencing by shRNA in the mouse reiterated autistic behaviors, such as impaired social interaction, hyperactivity and altered nest-building very much like those seen in the *Fmr1*-knockout mouse model (Tabet et al., 2016a). Based on these observations, it was proposed that a major molecular consequence of the loss of FMRP expression in FXS is to prevent DGK κ translation, leading to an alteration in DAG and PA levels in neurons (Tabet et al., 2016b). A main consequence of this imbalance would be the alteration of the downstream signaling

of DAG and PA required for maturation of dendritic spines and establishment of correct synaptic plasticity (Moine and Vitale, 2018).

Loss of function mutations in the gene encoding Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) lead to CLS, a rare syndromic form of mental retardation that shows X-linked inheritance. However, the molecular bases of the major neuronal alterations of CLS, such as moderate to severe defect in neurodevelopment, remain indefinable. In agreement with the notion that PLD1-generated PA is key to neurite outgrowth, we observed significant delayed in *Pld1* knockout neuron maturation (Ammar et al., 2013a). These observations were as well found in a mouse model for CLS syndrome since *Rsk2* knockout neurons exhibited developmental delay (Ammar et al., 2013a). Furthermore, RSK2 phosphorylates PLD1 at threonine 147 when exocytosis was triggered (Zeniou-Meyer et al., 2008) or during neurite outgrowth (Ammar et al., 2013a) in PC12 cells. A specific sensor for PA revealed an increase in PA levels at the tips of growing neurites in neurons resulting from PLD1 activation (Ammar et al., 2013a). Interestingly, PLD1 was found to be associated with BDNF positive endosomes (Ammar et al., 2015) and with vesicular structures derived from the trans Golgi, co-labeled by the vesicular SNARE VAMP-7/TiVAMP (Ammar et al., 2013a). The fusion efficiency of these PLD1/VAMP-7 vesicles in the growth cone was severely impaired by RSK2 and PLD1 inhibitors, suggesting that both PLD1 and RSK2 are necessary for membrane provision needed during neurite outgrowth (Ammar et al., 2013a). Accordingly, co-immunoprecipitation and confocal colocalization experiments indicated that RSK2 and PLD1 are found in a complex at the tip end of growing neurites, supporting the observation of an increased PA level at this location (Ammar et al., 2013a). Altogether, these results have highlighted the importance of PA-mediated membrane trafficking in neurite outgrowth and a key role of RSK2 in PA synthesis during this process, by phosphorylation and subsequent activation of PLD1. In consequence, it has been proposed that at least some of the clinical consequences of the CLS might result from an inadequate PA production during neuronal development and function (Zeniou-Meyer et al., 2010).

Neurodegeneration

It is becoming more and more evident that human neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease (AD) also have a critical lipidic feature in their outcome. This aspect has been first pointed out by the susceptibility of the ApoE4 allele to AD, but more recently PLDs have also been proposed to contribute to the development of the pathology. It was first shown that PLD1 is involved in the vesicular trafficking

of β APP (Cai et al., 2006) and later that increased expression of APP promoted PLD activity in human astroglia cells (Jin et al., 2007). Although highly debated, the observation that a rare variant of PLD3 gene confers susceptibility to AD has put PLD and PA on the spotlight (Cruchaga et al., 2014; Heilmann et al., 2015; Lambert et al., 2015; van der Lee et al., 2015). The most compelling evidence that defects in PA production by PLDs are involved in AD comes from an elegant study combining detailed lipidomics with behavioral tests in mouse models. In this study, the authors found that PLD2 knockout fully rescued AD-related synaptic dysfunction and cognitive deficits in a model of AD (Oliveira et al., 2010). The exact nature of the PA imbalance in AD awaits however to be fully defined and the possibility to interfere with AD condition by correcting this imbalance is probably very far from reach.

CONCLUSION

The diversity of mechanisms of PA signaling and physiological functions mostly relies on the fact that PA is synthesized by a complex set of different enzymes involved in diverse array of pathways. PLDs, DGKs, and LPAATs each constitute a big collection of isoenzymes differently localized within cells and displaying cell type specificity. In fact, the specific subcellular distribution, regulation, and/or substrate preferences of these enzymes probably account for the heterogeneity of PA composition in membranes. These aspects, altogether with the capacity of PA-binding modules in proteins to sense the local membrane environment and the type of PA species, offer a hub for the functional diversity of PA from molecular and cellular to physiological functions. There is no doubt that advanced lipidomics in combination with novel imaging tools to follow PA's dynamics will help to gain a better understanding of the apparent paradox of the abundance of function of this simple lipid. Further understanding of the biophysical side of PA's action on membranes is also critically needed to provide novel ideas for the treatment of the growing number of neuronal pathologies linked to the alterations of PA metabolism.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale and by Fondation Jérôme Lejeune funding to HM.

REFERENCES

- Ammar, M. R., Humeau, Y., Hanauer, A., Nieswandt, B., Bader, M. F., and Vitale, N. (2013a). The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neurite outgrowth through phosphorylation of phospholipase D1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid. *J. Neurosci.* 33, 19470–19479. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2283-13.2013
- Ammar, M. R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M. F., and Vitale, N. (2013b). Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front. Endocrinol.* 4:125. doi: 10.3389/fendo.2013.00125
- Ammar, M. R., Kassas, N., Bader, M. F., and Vitale, N. (2014). Phosphatidic acid in neuronal development: a node for membrane and cytoskeleton rearrangements. *Biochimie* 107, 51–57. doi: 10.1016/j.biochi.2014.07.026

- Ammar, M. R., Thahouly, T., Hanauer, A., Stegner, D., Nieswandt, B., and Vitale, N. (2015). PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Sci. Rep.* 5:14778. doi: 10.1038/srep14778
- Bader, M. F., and Vitale, N. (2009). Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 936–941. doi: 10.1016/j.bbali.2009.02.016
- Bruntz, R. C., Taylor, H. E., Lindsley, C. W., and Brown, H. A. (2014). Phospholipase D2 mediates survival signaling through direct regulation of Akt in glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 289, 600–616. doi: 10.1074/jbc.M113.532978
- Bullen, H. E., Jia, Y., Yamaryo-Botté, Y., Bisio, H., Zhang, O., Jemelin, N. K., et al. (2016). Phosphatidic acid-mediated signaling regulates microneme secretion in toxoplasma. *Cell Host Microbe* 19, 349–360. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.006
- Burkhardt, U., Wojcik, B., Zimmermann, M., and Klein, J. (2014). Phospholipase D is a target for inhibition of astroglial proliferation by ethanol. *Neuropharmacology* 79, 1–9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.002
- Cai, D., Zhong, M., Wang, R., Netzer, W. J., Shields, D., Zheng, H., et al. (2006). Phospholipase D1 corrects impaired β APP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 1936–1940. doi: 10.1073/pnas.0510710103
- Chae, Y. C., Kim, J. H., Kim, K. L., Kim, H. W., Lee, H. Y., Heo, W. D., et al. (2008). Phospholipase D activity regulates integrin-mediated cell spreading and migration by inducing GTP-Rac translocation to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 19, 3111–3123. doi: 10.1091/mbc.E07-04-0337
- Chasserot-Golaz, S., Coorssen, J. R., Meunier, F. A., and Vitale, N. (2010). Lipid dynamics in exocytosis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1335–1342. doi: 10.1007/s10571-010-9577-x
- Corrotte, M., Chasserot-Golaz, S., Huang, P., Du, G., Ktistakis, N. T., Frohman, M. A., et al. (2006). Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* 7, 365–377. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00389.x
- Corrotte, M., Nguyen, A. P., Harlay, M. L., Vitale, N., Bader, M. F., and Grant, N. J. (2010). Ral isoforms are implicated in Fcy R-mediated phagocytosis: activation of phospholipase D by RalA. *J. Immunol.* 185, 2942–2950. doi: 10.4049/jimmunol.0903138
- Cruchaga, C., Karch, C. M., Jin, S. C., Benitez, B. A., Cai, Y., Guerreiro, R., et al. (2014). Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature* 505, 550–554. doi: 10.1038/nature12825
- Daniels, R. H., Hall, P. S., and Bokoch, G. M. (1998). Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J.* 17, 754–764. doi: 10.1093/emboj/17.3.754
- Disse, J., Vitale, N., Bader, M. F., and Gerke, V. (2009). Phospholipase D1 is specifically required for regulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood* 113, 973–980. doi: 10.1182/blood-2008-06-165282
- Ehrhart, F., Roozen, S., Verbeek, J., Koek, G., Kok, G., van Kranen, H., et al. (2018). Review and gap analysis: molecular pathways leading to fetal alcohol spectrum disorders. *Mol. Psychiatry* 24, 10–17. doi: 10.1038/s41380-018-0095-4
- Faugaret, D., Chouinard, F. C., Harbour, D., El azreq, M. A., and Bourgoin, S. G. (2011). An essential role for phospholipase D in the recruitment of vesicle amine transport protein-1 to membranes in human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 81, 144–156. doi: 10.1016/j.bcp.2010.09.014
- Foster, D. A. (2009). Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 949–949. doi: 10.1016/j.bbali.2009.02.009
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., et al. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat. Commun.* 5:3477. doi: 10.1038/ncomms4477
- Hayashi, K., Ohshima, T., Hashimoto, M., and Mikoshiba, K. (2007). Pak1 regulates dendritic branching and spine formation. *Neurobiol.* 67, 655–669. doi: 10.1002/dneu.20363
- Heilmann, S., Drichel, D., Clarimon, J., Fernández, V., Lacour, A., Wagner, H., et al. (2015). PLD3 in non-familial Alzheimer's disease. *Nature* 520, E3–E5. doi: 10.1038/nature14039
- Holland, P., Knävelsrud, H., Sørensen, K., Mathai, B. J., Lystad, A. H., Pankiv, S., et al. (2016). HSI1BP3 negatively regulates autophagy by modulation of phosphatidic acid levels. *Nat. Commun.* 7:13889. doi: 10.1038/ncomms13889
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., et al. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521–532. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81540-8
- Humeau, Y., Gambino, F., Chelly, J., and Vitale, N. (2009). X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J. Neurochem.* 109, 1–14. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05881.x
- Humeau, Y., Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Dupont, J. L., Du, G., Frohman, M. A., et al. (2001). A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 15300–15305. doi: 10.1073/pnas.2613.58698
- Ito, S., Richert, N., and Pastan, I. (1982). Phospholipids stimulate phosphorylation of vinculin by the tyrosine-specific protein kinase of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 79, 4628–4631. doi: 10.1073/pnas.79.15.4628
- Jang, J.-H., Lee, C. S., Hwang, D., and Ryu, S. H. (2012). Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog. Lipid Res.* 51, 71–81. doi: 10.1016/j.plipres.2011.12.003
- Jenkins, G. M., and Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2305–2316. doi: 10.1007/s00018-005-5195-z
- Jin, J.-K., Ahn, B.-H., Na, Y.-J., Kim, J.-I., Kim, Y.-S., Choi, E.-K., et al. (2007). Phospholipase D1 is associated with amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 1015–1027. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.022
- Johnson, R. P., and Craig, S. W. (1995). The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 159–164. doi: 10.1006/bbrc.1995.1641
- Jose Lopez-Andreo, M., Gomez-Fernandez, J. C., and Corbalan-Garcia, S. (2003). The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase C ϵ to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 4885–4895. doi: 10.1091/mbc.e03-05-0295
- Kassas, N., Tanguy, E., Thahouly, T., Fouillen, L., Heintz, D., Chasserot-Golaz, S., et al. (2017). Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 292, 4266–4279. doi: 10.1074/jbc.m116.742346
- Klein, J. (2005). Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J. Neurochem.* 94, 1473–1487. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03315.x
- Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B., and Burger, K. N. (2003). Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* 4, 162–174. doi: 10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x
- Kurooka, T., Yamamoto, Y., Takai, Y., and Sakisaka, T. (2011). Dual regulation of RA-RhoGAP activity by phosphatidic acid and Rap1 during neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 286, 6832–6843. doi: 10.1074/jbc.m110.183772
- Lam, A. D., Tryoen-Toth, P., Tsai, B., Vitale, N., and Stuenkel, E. L. (2008). SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol. Biol. Cell* 19, 485–497. doi: 10.1091/mbc.e07-02-0148
- Lambert, J. C., Grenier-Boley, B., Bellenguez, C., Pasquier, F., Campion, D., Dartigues, J. F., et al. (2015). PLD3 and sporadic Alzheimer's disease risk. *Nature* 520:E1. doi: 10.1038/nature14036
- Lopez, C. I., Pelletán, L. E., Suhaiman, L., De Blas, G. A., Vitale, N., Mayorga, L. S., et al. (2012). Diacylglycerol stimulates acrosomal exocytosis by feeding into a PKC- and PLD1-dependent positive loop that continuously supplies phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 1186–1199. doi: 10.1016/j.bbali.2012.05.001
- Mima, J., and Wickner, W. (2009). Complex lipid requirements for SNARE- and SNARE chaperone-dependent membrane fusion. *J. Biol. Chem.* 284, 27114–27122. doi: 10.1074/jbc.m109.010223
- Moine, H., and Vitale, N. (2018). Of local translation control and lipid signaling in neurons. *Adv. Biol. Regul.* doi: 10.1016/j.jbior.2018.09.005 [Epub ahead of print].
- Nishikimi, A., Fukuhara, H., Su, W., Hongu, T., Takasuga, S., Mihara, H., et al. (2009). Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* 324, 384–387. doi: 10.1126/science.1170179
- Oliveira, T. G., Chan, R. B., Tian, H., Laredo, M., Shui, G., Staniszewski, A., et al. (2010). Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *J. Neurosci.* 30, 16419–16428. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3317-10.2010

- Park, M. H., Ahn, B. H., Hong, Y. K., and 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- κ B/Sp1-mediated signaling pathways. *Carcinogenesis* 30, 356–365. doi: 10.1093/carcin/bgn287
- Pelletán, L. E., Suhaiman, L., Vaquer, C. C., Bustos, M. A., De Blas, G. A., Vitale, N., et al. (2015). ADP ribosylation factor 6 (ARF6) promotes acrosomal exocytosis by modulating lipid turnover and Rab3A activation. *J. Biol. Chem.* 290, 9823–9841. doi: 10.1074/jbc.m114.629006
- Pokotylo, I., Kravets, V., Martinec, J., and Ruelland, E. (2018). The phosphatidic acid paradox: too many actions for one molecule class? Lessons from plants. *Prog. Lipid Res.* 71, 43–53. doi: 10.1016/j.plipres.2018.05.003
- Potocký, M., Pleskot, R., Pejchar, P., Vitale, N., Kost, B., and Zárský, V. (2014). Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derive biosensor. *New Phytol.* 203, 483–494. doi: 10.1111/nph.12814
- Raben, D. M., and Barber, C. N. (2017). Phosphatidic acid and neurotransmission. *Adv. Biol. Regul.* 63, 15–21. doi: 10.1016/j.jbior.2016.09.004
- Roach, A. N., Wang, Z., Wu, P., Zhang, F., Chan, R. B., Yonekubo, Y., et al. (2012). Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization. *J. Lipid Res.* 53, 2598–2609. doi: 10.1194/jlr.m028597
- Sanematsu, F., Nishikimi, A., Watanabe, M., Hongu, T., Tanaka, Y., Kanaho, Y., et al. (2013). Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. *J. Biol. Chem.* 288, 8092–8100. doi: 10.1074/jbc.m112.410423
- Schwarz, K., Natarajan, S., Kassas, N., Vitale, N., and Schmitz, F. (2011). The synaptic ribbon is a site of phosphatidic acid generation in ribbon synapses. *J. Neurosci.* 31, 15996–16011. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2965-11.2011
- Stace, C. L., and Ktistakis, N. T. (2006). Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 913–926. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.03.006
- Tabet, R., Moutin, E., Becker, J. A., Heintz, D., Fouillen, L., Flatter, E., et al. (2016a). Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, E3619–E3628. doi: 10.1073/pnas.1522631113
- Tabet, R., Vitale, N., and Moine, H. (2016b). Fragile X syndrome: are signaling lipids the missing Culprits? *Biochimie* 130, 188–194. doi: 10.1016/j.biochi.2016.09.002
- Tanguy, E., Carmon, O., Wang, Q., Jeandel, L., Chasserot-Golaz, S., Montero-Hadjadje, M., et al. (2016). Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J. Neurochem.* 137, 904–912. doi: 10.1111/jnc.13577
- Tanguy, E., Kassas, N., and Vitale, N. (2018). Protein-phospholipid interaction motifs: a focus on phosphatidic acid. *Biomolecules* 8:E20. doi: 10.3390/biom8020020
- van den Bout, I., and Divecha, N. (2009). PIP5K-driven PtdIns(4,5)P₂ synthesis: regulation and cellular functions. *J. Cell Sci.* 122, 3837–3850. doi: 10.1242/jcs.056127
- van der Lee, S. J., Holstege, H., Wong, T. H., Jakobsdottir, J., Bis, J. C., Chouraki, V., et al. (2015). PLD3 variants in population studies. *Nature* 520, E2–E3. doi: 10.1038/nature14038
- Vitale, N., Caumont, A. S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V. A., et al. (2001). Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 20, 2424–2434. doi: 10.1093/emboj/20.10.2424
- Waselle, L., Gerona, R. R., Vitale, N., Martin, T. F., Bader, M. F., and Regazzi, R. (2005). Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol. Endocrinol.* 19, 3097–3106. doi: 10.1210/me.2004-0530
- Wildburger, N. C., Wood, P. L., Gumin, J., Lichti, C. F., Emmett, M. R., Lang, F. F., et al. (2015). ESI-MS/MS and MALDI-IMS localization reveal alterations in phosphatidic acid, diacylglycerol, and DHA in glioma stem cell xenografts. *J. Proteome Res.* 14, 2511–2519. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00076
- Williams, J. M., Pettitt, T. R., Powell, W., Grove, J., Savage, C. O., and Wakelam, M. J. (2007). Antineutrophil cytoplasm antibody-stimulated neutrophil adhesion depends on diacylglycerol kinase-catalyzed phosphatidic acid formation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1112–1120. doi: 10.1681/asn.2006090973
- Yang, J. S., Gad, H., Lee, S. Y., Mironov, A., Zhang, L., Beznoussenko, G. V., et al. (2008). A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance. *Nat. Cell Biol.* 10, 1146–1153. doi: 10.1038/ncb1774
- Zeniou-Meyer, M., Gambino, F., Ammar, M. R., Humeau, Y., and Vitale, N. (2010). The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 and neurosecretion. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1401–1406. doi: 10.1007/s10571-010-9578-9
- Zeniou-Meyer, M., Liu, Y., Béglé, A., Olanich, M. E., Hanauer, A., Becherer, U., et al. (2008). The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 8434–8439. doi: 10.1073/pnas.0710676105
- Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeblerlé, A. M., Demais, V., et al. (2007). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* 282, 21746–21757. doi: 10.1074/jbc.m702968200

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Tanguy, Wang, Moine and Vitale. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Bovine chromaffin cells: culture and fluorescent assay for secretion

Thahouly T, Tanguy E, Raherindratsara J, Bader, M-F, Chasserot-Golaz S, Gasman S, and Vitale N

Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France.

Abstract

Over the last four decades chromaffin cells originating from the adrenal medulla have been probably one of the most popular cell model to study neurosecretion at the molecular level. Accordingly numerous seminal discoveries in the field including the characterization of role of the cytoskeleton, fusogenic lipids and SNARE proteins have been made with this model. In this chapter, we describe a standard method currently used to isolate and culture bovine chromaffin cells and we illustrate a catecholamine secretion assay based on the successive transformation of adrenaline into adrenochrome and adrenolutine for fluorescence measurements. We also provide some guidelines for efficient cell recovery and for the use of this assay in the laboratory.

1. Introduction

Understanding at the molecular level how neurons communicate has been one of the most challenging goals of modern biology. A key step in improving this understanding was obtained by the discovery of some of the main players of the minimal protein machinery involved in synaptic vesicle and neuroendocrine granule exocytosis. Among the cell culture models that have provided insight into the molecular machinery underlying the successive steps of exocytosis, adrenal medulla chromaffin cells have taken a prominent place (1). By offering the opportunity to combine the use of electrophysiological approaches with molecular biology for specific protein modifications and recent imaging techniques allowing single-vesicle resolution, chromaffin cells remain an influential model to address open questions in the field of secretion and exocytosis. In addition to the measure of single cell secretion by amperometry or capacitance, chromaffin cells have been widely used for cell population secretion assay. These assays were largely based on the use of either radiolabeled catecholamines or a reporter for secretion such as human growth hormone specifically stored in secretory granules when expressed in chromaffin cells (2-4). Although the later assay, by co-expressing the reporter with molecular tools, offers the possibility to measure secretory activity in a subpopulation of cells of interest, it remains important to be able to measure the secretory activity of large population of non-transfected cells, for instance to test the effect of pharmacological compounds on chromaffin cell secretion. Thus to substitute for the use of radioactive compounds, we have developed a fluorescent assay based on the successive oxidation of noradrenaline and adrenaline into noradrenolutine and adrenolutine, respectively. In this chapter, we describe the detailed procedure for culturing bovine chromaffin cells and for measuring their secretory activity by a fluorescent-based method.

2. Materials and solutions

2.1. General supplies for cell culture and secretion assay

Some procedures to culture rat and mouse chromaffin cells have been carefully described previously (5). All procedures described here for bovine chromaffin cells require standard culture room facilities with a laminar flow cabin, a dry bead sterilizer burner, a water bath set at 37°C and a 37°C incubator with a water saturated atmosphere containing 5% CO₂. An inverted microscope with phase contrast and two centrifuges are also required. Other required

materials and basic solutions include:

1. Syringes and 0.22- μ m syringe filters;
2. Adjustable volume pipettes with sterile tips;
3. 50 mL conical centrifuge tubes (OAK Ridge ThermoScientific);
4. Hemocytometer (Neubauer);
5. Sterile surgical material required: forceps, scissors, and scalpel blades;
6. For the physical separation of cells, 250 mL centrifuge tubes are cut at the bottom; plugs are cut and used to adjust 217 μ m mesh sieve filters (SAATI, Milan, Italy). These ensembles are then autoclaved in aluminum foil;
7. 70 μ m mesh filter (Falcon);
8. 100 mm diameter Petri dishes for glands dissection;
9. Large glass tray (30 cm by 20 cm) and glass beakers 250-mL;
10. A centrifuge capable of reaching 20,000 g for Percoll gradient;
11. 96-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, France) for cell culture.

The following equipment is needed for the measurement of catecholamine levels from cultured chromaffin cells using a fluorescence-based assay:

1. 96-well black-plates (Thermo Scientific) for the secretion assay;
2. Two Eppendorf research plus adjustable volume multichannel pipettes and 5-10 multichannel disposable solutions basins (Thermo Fisher);
3. Fluorimeter allowing excitation at 430 nm and emission at 520 nm of 96-well plates. We use a LB940 Mitras (Berthold).

2.2. Solutions and medium for culture and secretion assay

1. Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free concentrated Krebs solution: 1.54 M NaCl, 56 mM KCl, 36 mM NaHCO_3 , 56 mM glucose, and 50 mM HEPES pH 7.4. This solution is filtered through 0.22- μ m syringe filters. For each culture, 50 mL of concentrated Krebs solution is diluted in 450 mL of cell culture water grade to obtain 500 mL of Krebs balanced salt solution;
2. Trypan blue (Sigma): 0.4% in Krebs balanced salt solution;
3. Cytosine arabinoside (Sigma): 30 mg in 100 mL Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) and filter sterilized;
4. Fluorodeoxyuridine (Sigma): 24.6 mg in 10 mL Krebs balanced salt solution and filter sterilized;

5. We use standard DMEM supplemented with glutamine (Sigma) to prepare chromaffin cells (DMEM-D). 1 mL Primocin (Invivogen) at 50 mg/mL is added to 500 mL of DMEM-D to prevent Gram+ and Gram- bacteria, mycoplasmas and fungi contaminations. Depending on plating needs (see below), this medium is further completed with 1% cytosine arabinoside and 0.1% fluorodeoxyuridine solutions and 10% fetal bovine serum previously decontaminated 30 min at 56°C (Gibco, see Note 1) to obtain DMEM-C.
6. Collagenase solution is prepared with 70 mg of collagenase A (Sigma, 0.235 U/mg), 100 mg of bovine serum albumin fraction V (BSA), 2 mL of concentrated Krebs solution. Adjust to 20 mL with Volvic commercial water, mix well and filter sterilize. Prepare 20 mL of collagenase solution per gland to be treated.
7. Percoll solution is prepared by mixing 18 mL of Percoll (GE Healthcare) with 2 mL of concentrated Krebs solution. Discard 1 mL and save 19 mL of the solution for later use.
8. Locke's solution: 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 10 mM EDTA, 11 mM glucose, 0.57 mM ascorbic acid, and 15 mM HEPES pH=7.5.
9. Nicotine (Sigma) is diluted first in Locke's solution at 1M and stored protected from light. This intermediate dilution can be used within few hours to prepare the final 10 μM nicotine solution in Locke's solution.
10. High potassium Locke's solution: Prepare Locke solution with 59 mM KCl and NaCl adjusted to 85.7 mM to maintain osmolarity.
11. Sodium acetate solution 1M adjusted to pH=6 with concentrated acetic acid.
12. 0.25% (w/v) of potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆).
13. Sodium hydroxide 5 M containing 0.2% (w/v) of ascorbic acid.
14. Triton X-100 is diluted to 0.1% in water and stored at room temperature protected from light.

3. Bovine chromaffin cell culture procedure

Glands may be obtained from the local slaughterhouse and it is recommended collecting them from the carcass as early as possible after the animal's death. The shape of the two adrenal glands is different with the left "bean-shape" gland being more suitable for the following procedure. Collect only intact glands to avoid contamination and discard those with visible signs of internal blood coagulation. Leave significant level of fat at this stage as it provides protection against contamination. We recommend transporting the glands in an ice-cold

plastic container with 200 mL of Krebs balanced salt solution containing Primocin if the delay between animal's death and the start of the culture exceeds one hour. Other protocols for bovine cell culture preparation have been published elsewhere (5-12).

Once in the culture room, remove the surrounding fat from the glands under a laminar flow cabin. The general procedure to minimize contamination is to proceed progressively from a nonsterile (transport containers, external fat) to a sterile environment. It is advisable to sterilize the surgical instruments frequently in the dry bead sterilizer. Once the glands are clean of surrounding fat and connective tissue, remove all the material used and discard the tissue from the hood.

The procedure described below is intended for six glands but can be easily adapted for more glands.

1. Prepare the collagenase solution. Each gland will require 20 mL of collagenase solution. These calculations are aimed for a commercial collagenase with an activity of 0.235 U/mg, and should be adjusted according to enzyme activity (see Note 3);
2. Place the glands in a sterile Petri dish and inject each gland twice with 3-4 mL of warm (37°C) Krebs balanced salt solution to remove blood cells;
3. Inject the glands with 3-10 mL of collagenase solution depending on the size of the gland and place the glands standing in a 250 mL beaker. Try to avoid accumulation of liquid in the bottom of the beaker, which could contaminate the gland and cover the beaker with a sterile aluminum foil;
4. Repeat step 3 after 10 min. Caution should be taken when performing the second injection as the gland is partially digested and may rupture with excessive pressure. After 10 min, the glands should be noticeably softer indicating the success of the digestion. It is important to keep the collagenase incubation time to a minimum to avoid over-digestion of the medulla;
5. Open the gland longitudinally (along the long axis of the gland) using a scalpel and clean scissors to reveal the cream-colored medulla;
6. Use scalpels to collect the medulla and transfer it to a clean Petri dish. Do not collect any purple material containing cortical cells. This procedure should be performed swiftly;
7. Blades mince the tissue into small pieces using two scalpels;
8. Transfer the material to the homemade filter (mesh 217 μm);
9. Push cells mechanically through the filter using a sterile glass rod of a Dounce homogenizer in Krebs balanced salt solution;

9. Collect the solution in 50 mL Falcon tubes and gently pellet the cells by centrifuging 10 min at 100 g. The supernatant is discarded and the cells suspended in a final volume of 20 mL of Krebs balanced salt solution;
10. Filter cells by flow-gravity through a 70 μm mesh filter;
11. Collect about 19 mL of cell suspension, add 19 mL of the Percoll solution and gently mix;
12. Centrifuge at 20,000 g for 20 min at 24-26°C without brake to make the self-generated Percoll gradient (13-14). Be careful to equilibrate the tubes before spinning;
13. Collect with a plastic Pasteur pipette the chromaffin cells in the interface of the gradient. Note that the bottom of the tubes contains red blood cells that should be discarded. Discard 2-5 mL of the top gradient containing broken and cortical cells;
14. Collect around 15-18 mL containing chromaffin cells and dispatch into 4 50-mL Falcon tubes;
15. Complete each tube with DMEM-D up to 50 mL and centrifuge 10 min at 100 g at 20°C;
16. Resuspend the pellets in 10 mL of DMEM-D (see Note 1);
17. Count the cells in Trypan blue solution to estimate cell viability using a hemocytometer (15). Prepare an aliquot of the cell sample for counting by adding 100 μl 0.1% trypan blue stock solution (final concentration of 0.05% trypan blue) and 80 μl of Krebs balanced salt solution to 20 μl cell suspension in a 1.5-ml microcentrifuge tube. A typical yield is around 15×10^6 chromaffin cells per adrenal gland.
18. Plate the cells according to the needs (see below) in DMEM-C and keep for up to two weeks (Figure 1).

4. Fluorescence assay to measure catecholamine secretion

Several companies sell kits to measure catecholamine levels developed for measurements in body fluid samples that are quite sensitive, but also rather tedious and expensive. The following assay based on the oxidation of catecholamine into aminochrome (16), subsequently converted into aminolutine (Figure 1) is much faster as it can be run in less than two hours and is extremely cheap.

The use of adjustable volume multichannel pipette during the following steps minimizes pipetting and potential mistakes, but one should take care that each tip is always well adjusted to the holder. Each reagent is collected from a multichannel disposable solution basin that can be washed for reuse in a novel experiment. We recommend evaluating the sensitivity of the assay with chromaffin cells that you have prepared.

1. Plate freshly cultured chromaffin cells in 96-well plates at a density of 50,000; 100,000; or 200,000 cells in 200 μ L of DMEM-D per well for 24h to 48h.
2. Place cells on a heated plate at 37°C and wash four times with 200 μ L of Locke's solution at 37°C for 10 min.
3. Incubate with 50 μ L of Locke's solution (resting condition) or stimulate with Locke's containing 10 μ M of nicotine or high potassium Locke's solution at 37°C for 10 min. Typically four to eight wells were used per condition, providing 12 to 24 different conditions in a 96-well plate. Collect carefully the media containing the secreted material and briefly centrifuge 5 min at 10,000 g to pellet cells that came off the plate. Store at 4°C.
4. Lyse the remaining cells by adding 200 μ L of Triton X-100 1% for 10 min at 37°C, followed by three freeze and thaw cycle and careful shaking of the plate.
5. Dispatch 20 μ L aliquots of secreted media and lysed cell solutions into two 96-well black-plates. 20 μ L of Locke's and 0.1% Triton X100 solutions are also plated in one well of each plate to serve as blank reference.
5. Add successively 150 μ L of sodium acetate 1M and 15 μ L of potassium ferricyanide 0.25% to each well to oxidize catecholamines to adrenochrome and noradrenochrome (Figure 2). Shake gently for a couple of minutes. Formation of aminochromes occurs readily when catecholamines come into contact with Fe and display a deep red colour. Because aminochromes are also quite unstable they are not ideally suited for quantitative measurement.
6. Add 50 μ L of sodium hydroxyde (5M) to convert aminochromes to aminolutins (Figure 2) (17). Ascorbic acid (0.2% (w/v)) is included in the alkali reagent to prevent further oxidation (see note 4).
7. Measure the fluorescence emitted by adrenolutin and noradrenolutin in secreted media (S) and in the cell pellets (P) (lex: 430nm, lem: 520 nm) with a spectrofluorometer. Blank values (Locke's and 0.1% Triton X-100 solutions) are subtracted to individual values obtained on the respective plates. For each experiment standard curves are determined using known concentration of adrenaline and noradrenaline to demonstrate that the values obtained are in the linear range of detection of the assay (Figure 3). In our hands, the assay is linear up to 200 ng/ μ L of catecholamines and is sensitive above 3 ng/ μ L (box in Figure 3). It is of note that this assay does display any significant sensitivity difference between adrenaline and noradrenaline, indicating that it is well suited to measure the secretory activity of mixed adrenergic and noradrenergic cell population. Moreover, this assay does not detect dopamine even at high levels, and as such is not adapted for PC12 cells. Note that in order to avoid

variations originating from differences in cell quantities per well, catecholamine amount released (X) is better expressed as a percentage of the total amount of catecholamine present in cells before stimulation using the following formula:

$$\text{Catecholamine release (\% of total)} = \frac{S \times 2.5}{(S \times 2.5) + (P \times 10)}$$

S is the reading of one individual secreted medium aliquot

P is the reading of the corresponding cell aliquot

Among the secretagogues tested here, nicotine is more efficient than high potassium to trigger catecholamine secretion from bovine chromaffin cells (Figure 4). The secretion levels observed using this assay are very similar to those obtained with [³H] Nordadrenaline (18-21). We also found that the levels of basal release measured from 50,000 cells are usually close to the detection limit and therefore less accurately estimated. In conclusion using 100,000 or 200,000 cells per well appears well adapted for this secretion assay.

Notes

1. The isolation procedure should focus first on obtaining healthy cells rather than the highest yield. We recommend adjusting the concentration of collagenase used for digestion and minimizing the mechanical disruption during tissue digestion.
2. Although cells can be maintained for over a week after plating, optimal secretion usually occurs within 24-48 h of plating. However, we noticed that in some rare cases nicotine was unable to trigger catecholamine release, especially in the first days of culture, most likely because of partial degradation of the nicotinic receptor by collagenase.
3. A standard Neubauer hemocytometer remains a valuable and cheap tool to count cells and to get a general idea of their viability and contamination with erythrocytes. We prepare a 1:9 dilution of cells by mixing 20 μL of cell suspension + 100 μL of Krebs balanced salt solution + 80 μL of trypan blue staining solution (see above). Guidelines for the correct use of hemocytometers have been published previously (15).
4. Note that the fluorescence will slowly decay with time, so it is best to do the reading as soon as the assay is finished.

Acknowledgments

We thank Dr. F.A. Meunier (University of Queensland, Brisbane, Australia) for sharing an original fluorescence assay for catecholamine secretion. We are indebted to the Abattoir de Haguenau for providing us with the fresh bovine adrenal medulla. This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale and the ANR grant (ANR-18-CE12-0002-02) to NV.

Figure 1: Images of bovine chromaffin cells in culture. DIC images of bovine chromaffin cells after 4 (A) or 12 (B) days in culture. Bars = 10 μm .

Figure 2: Principle of the fluorimetric catecholamine assay. Noradrenaline is synthesized from dopamine by dopamine β -hydroxylase (DBH) and further transformed into adrenaline by phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT). Catecholamine (adrenaline and noradrenaline) oxidation by sodium acetate in the presence of potassium ferricyanide leads to the production of aminochromes. Unstable, these compounds are transformed into aminolutines in the presence of sodium hydroxide. These aminolutines emit at 530 nm when excited at 430 nm.

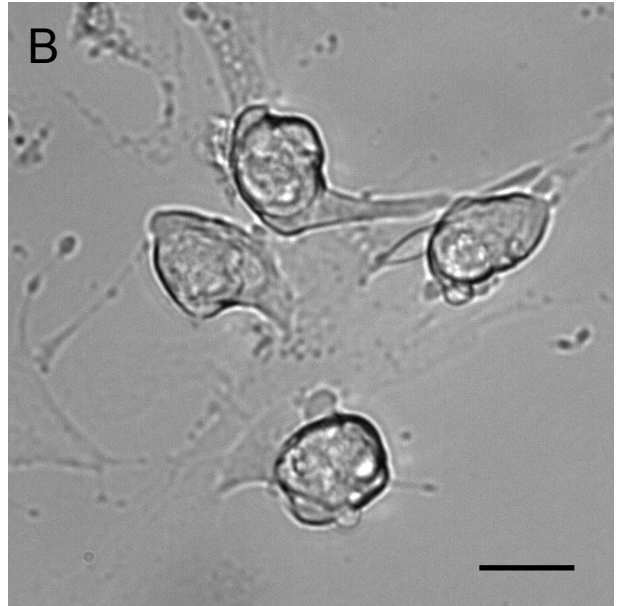
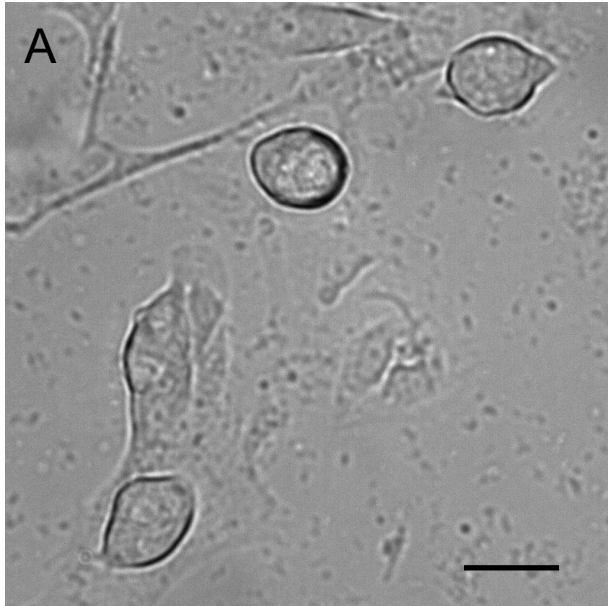
Figure 3: Standard curve for adrenaline and noradrenaline detection using the fluorimetric catecholamine assay. Stock solutions of adrenaline, noradrenaline, and dopamine were serially diluted and 20 μL aliquots were used for the fluorimetric catecholamine assay. The pink box indicates the concentration of catecholamine for which the assay is linear. $n = 8$ samples per condition and S.E.M. smaller than symbols are not visible.

Figure 4: Secretion of catecholamines triggered by nicotine and high potassium and measured by a fluorimetric catecholamine assay. 50,000; 100,000; or 200,000 cells were seeded per well in a 96-well plate for 24h. After four washes with Locke's solution, cells were incubated 10 min at 37°C in Locke's solution (resting) or stimulated with Locke's solution containing 10 μM of nicotine or 59 mM potassium solution. Catecholamine levels secreted in the medium and remaining in cells were estimated using a fluorimetric assay. The secretory activity is expressed as a percentage of the total amount of catecholamine present in cells before stimulation. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$).

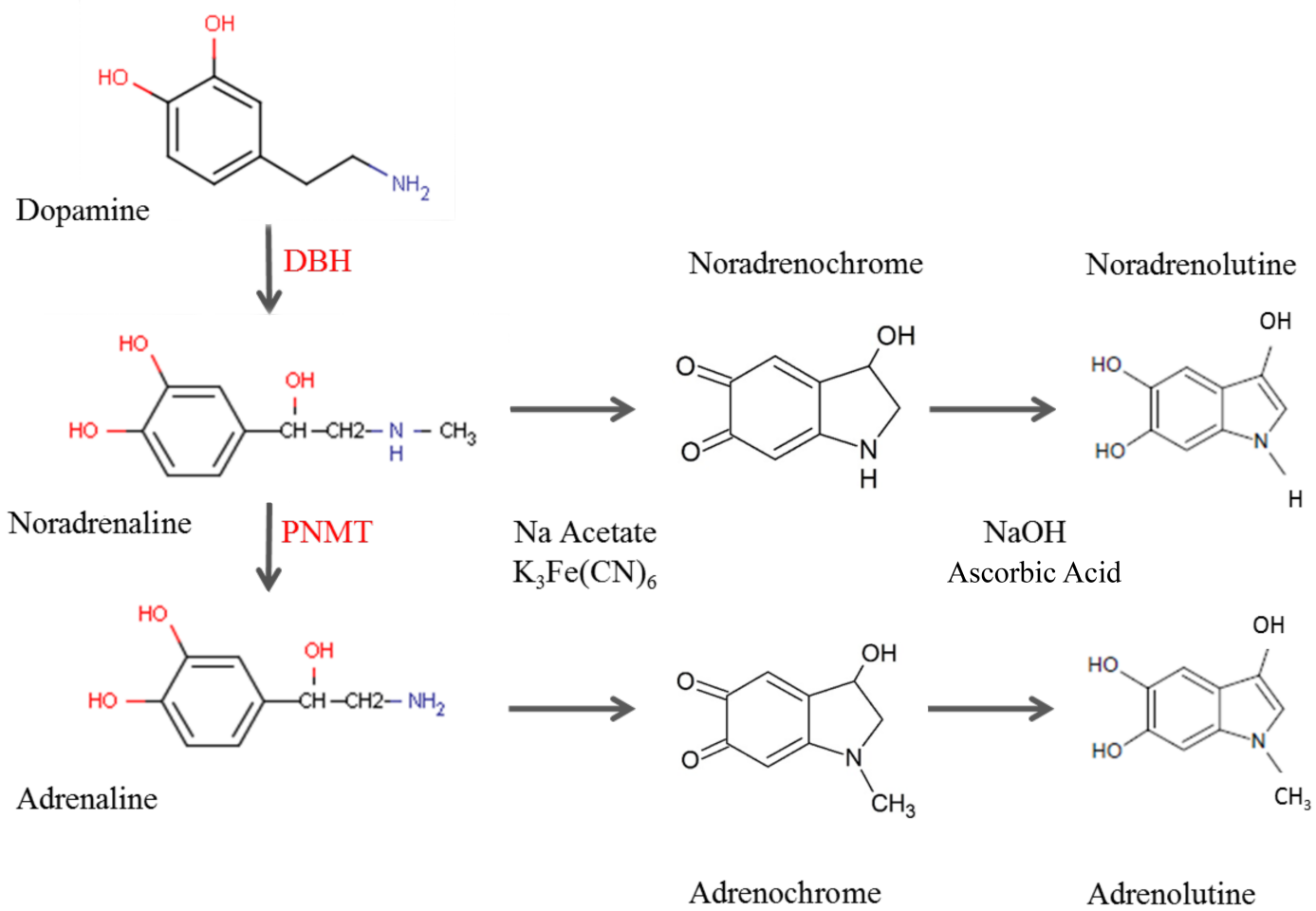
References

1. Bader MF, Holtz RW, Kumakura K, and Vitale N (2002) Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann NY Acad Sci* 971:178-183
2. Vitale N, Gensse M, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Bader MF (1996) Trimeric G proteins control regulated exocytosis in bovine chromaffin cells: sequential involvement of G_o associated with secretory granules and G_{i3} bound to the plasma membrane. *Eur J Neurosci* 8:1275-1285
3. Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanich ME, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader MF, Vitale N. (2008) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8434-8439
4. Béglé A, Tryoen-Tóth P, de Barry J, Bader MF, Vitale N. (2009) ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 284:4836-4845
5. Domínguez N, Rodríguez M, Machado JD, and Borges R. (2012) Preparation and culture of adrenal chromaffin cells. *Methods Mol Biol* 846:223-234
6. Kloppenborg PW, Island DP, Liddle GW, Michelakis AM, and Nicholson WE (1968) A method of preparing adrenal cell suspensions and its applicability to the in vitro study of adrenal metabolism. *Endocrinology* 82:1053-1058
7. Hochman J, and Perlman RL (1976) Catecholamine secretion by isolated adrenal cells. *Biochim Biophys Acta* 421:168-175
8. O'Connor DT, Mahata SK, Mahata M, Jiang Q, Hook VY, and Taupenot L (2007) Primary culture of bovine chromaffin cells. *Nat Protoc* 2:1248-1253
9. Krause W, Michael N, Lubke C, Livett BG, and Oehme P (1996) Catecholamine release from fractionated chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 302:223-228
10. Livett BG, Boksa P, Dean DM, Mizobe F, and Lindenbaum MH (1983) Use of isolated chromaffin cells to study basic release mechanisms. *J Auton Nerv Syst* 7:59-86
11. Bader MF, Ciesielski-Treska J, Thierse D, Hesketh JE, and Aunis D (1981) Immunocytochemical study of microtubules in chromaffin cells in culture and evidence that tubulin is not an integral protein of the chromaffin granule membrane. *J Neurochem* 37:917-933
12. Baker PF, and Knight DE (1981) Calcium control of exocytosis and endocytosis in bovine adrenal medullary cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 296:83-103

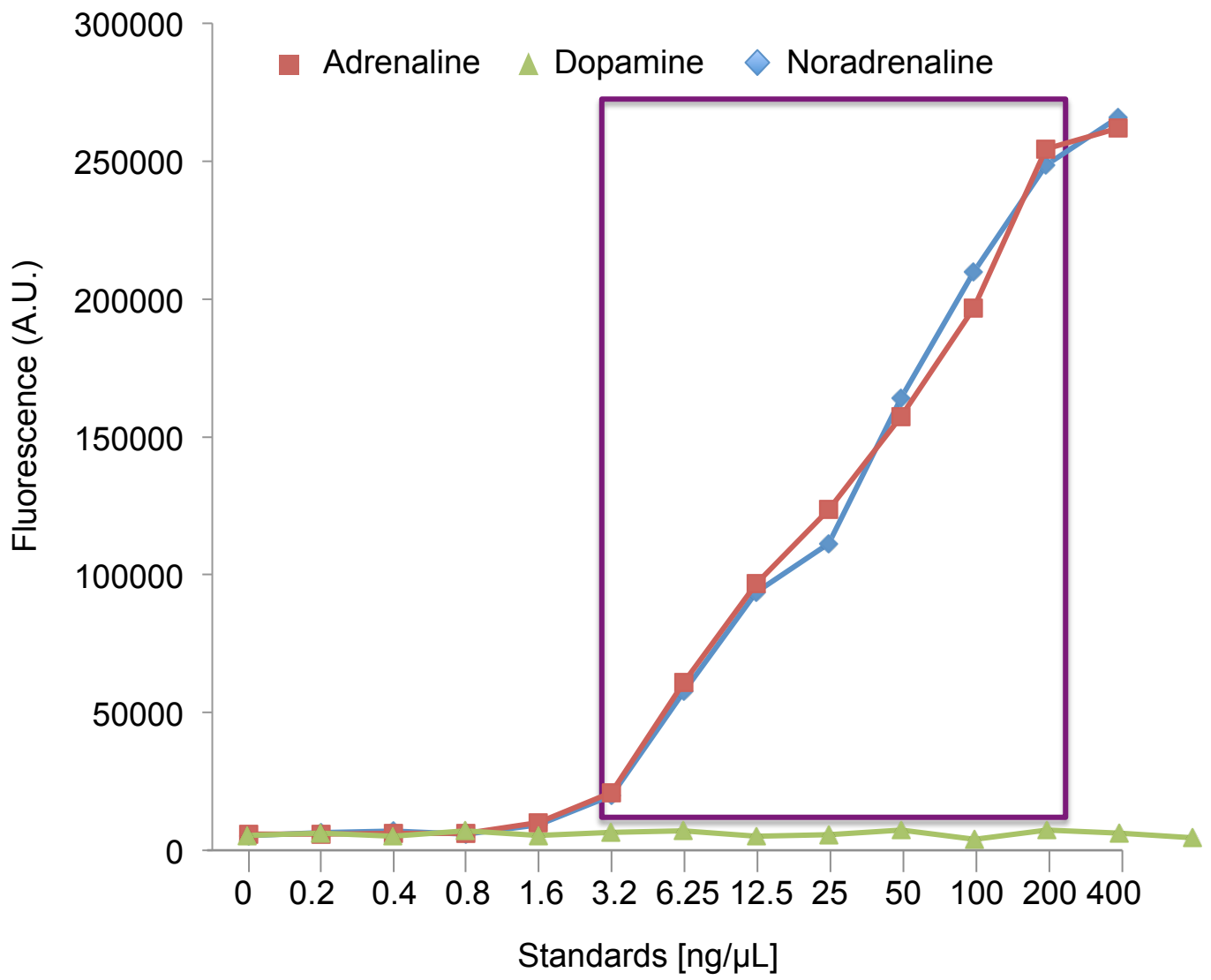
13. Bader MF, Trifaró JM, Langley OK, Thiersé D, Aunis D. (1986) Secretory cell actin-binding proteins: identification of a gelsolin-like protein in chromaffin cells. *J Cell Biol* 102:636-646
14. Bader MF, Thiersé D, Aunis D, Ahnert-Hilger G, Gratzl M. (1986) Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J Biol Chem* 261:5777-5783
15. Strober W (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* Appendix 3, Appendix 3B
16. Meunier FA, Feng ZP, Molgo J, Zamponi GW, and Schiavo G. (2002) Glycerotoxin from *Glycera convoluta* stimulates neurosecretion by up-regulating N-type Ca²⁺ channel activity, *EMBO J* 21:6733-6743
17. Heacock RA, and Laidlaw BD. (1958) Reduction of adrenochrome with ascorbic acid, *Nature* 182:526-527
18. Vitale N, Mukai H, Rouot B, Thiersé D, Aunis D, and Bader MF. (1993) Exocytosis in chromaffin cells. Possible involvement of the heterotrimeric GTP-binding protein Go. *J Biol Chem* 268:14715-14723
19. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader MF. (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16:1108-1119
20. Tryoen-Tóth P, Chasserot-Golaz S, Tu A, Gherib P, Bader MF, Beaumelle B, Vitale N. (2013) HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Sci* 126 :454-463
21. Gabel M, Delavoie F, Royer C, Tahouly T, Gasman S, Bader MF, Vitale N, Chasserot-Golaz S. (2019) Phosphorylation cycling of Annexin A2 Tyr23 is critical for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866:1207-1217
- 22.



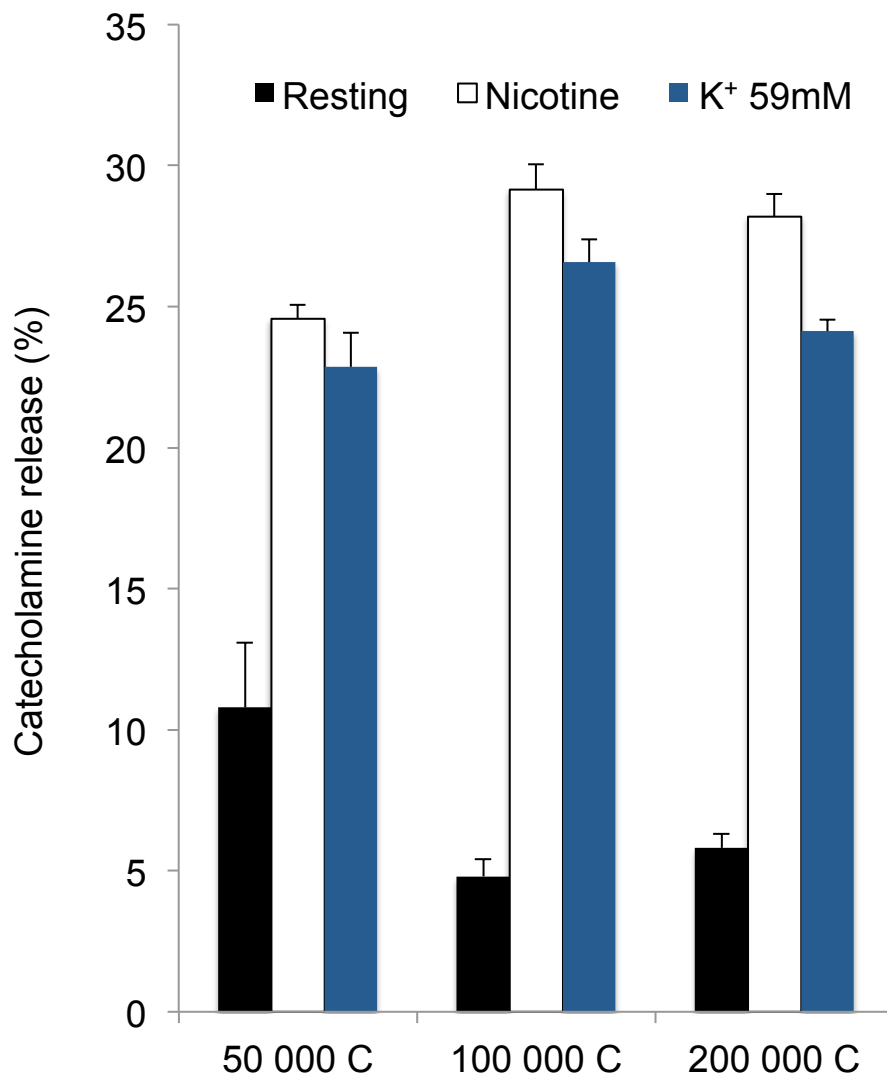
Thahouly et al., Figure 1



Thahouly et al., Figure 2



Thahouly et al., Figure 3



Thahouly et al., Figure 4

Émeline TANGUY

Implication de l'acide phosphatidique dans le trafic membranaire : rôle et régulation de la phospholipase D au cours de la phagocytose et de l'exocytose régulée

Résumé

La mise en évidence du rôle des lipides dans le trafic membranaire fait partie des avancées majeures de ces dernières années. Mes travaux de thèse se sont focalisés sur le plus simple des phospholipides, l'acide phosphatidique (PA). La production de PA par la phospholipase D (PLD) joue un rôle crucial au cours de la phagocytose et l'exocytose régulée, mais la dynamique de sa formation, tout comme les mécanismes d'action des différentes formes de PA, restent à ce jour totalement inconnus. Durant mon doctorat, j'ai contribué à la caractérisation de trois domaines de liaison peptidique au PA, qui nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'interaction des protéines avec le PA et de générer des sondes moléculaires pour repérer ce lipide au sein des cellules. Ainsi, j'ai pu visualiser la production de PA au cours de la phagocytose et mis en évidence l'implication de la GTPase Arf6 dans la régulation de la synthèse de PA par la PLD. J'ai également pu montrer que la PLD est impliquée dans plusieurs étapes de l'exocytose dans des cellules neuroendocrines. Des expériences de lipidomique et de restauration ont révélé notamment que des formes mono- et polyinsaturées du PA contrôlent des étapes distinctes de l'exocytose que j'ai pu définir.

Mots-clés :

lipides - phospholipase D - acide phosphatidique - phagocytose - exocytose - cellule neuroendocrine

Abstract

The discovery of the involvement of lipids in membrane trafficking is one of the major recent progress in cell biology. My thesis work focused on phosphatidic acid (PA), the simplest phospholipid. PA synthesis by phospholipase D (PLD) plays a crucial role during phagocytosis and regulated exocytosis, but its precise dynamics, as well as the mode of action of the different PA species, remain unknown. I characterized three PA binding domains allowing a better understanding of the interaction between proteins and PA and leading to the generation of genetic sensors for PA in cells. Thus I could visualize PA synthesis during phagocytosis and identified that the small GTPase Arf6 regulates PLD activity and consequently PA synthesis. My work also reveals that PLD modulates several steps during exocytosis in neuroendocrine cells. Further lipidomics and rescue experiments allowed me to show that mono- and polyunsaturated forms of PA are involved in distinct steps of exocytosis.

Keywords:

lipids - phospholipase D - phosphatidic acid - phagocytosis - exocytosis - neuroendocrine cell