

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I

## DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT (Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : 14 décembre 2016

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Renaud RAHIER**

Titre de la thèse : « Caractérisation biochimique des phospholipases D et de leurs domaines fonctionnels. Nouvelle méthode de mesure de l'activité phospholipase D. »

### Résumé de la thèse

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

La phospholipase D (PLD) hydrolyse les phospholipides membranaires en libérant leur tête polaire afin de générer l'acide phosphatidique (PA), impliqué dans la signalisation cellulaire. Pour comprendre les propriétés biochimiques des PLDs, les travaux présentés ont été réalisés autour de deux axes. Le premier axe concerne l'expression recombinante et la purification de la PLD $\alpha$  d'*Arabidopsis thaliana* (AtPLD $\alpha$ ) dans la levure *Pichia pastoris*. La détermination de la séquence N-terminale a révélé que l'AtPLD $\alpha$  est amputée de ses 35 premiers résidus, suggérant ainsi la participation d'un mécanisme de maturation. Cependant, la région N-terminale des PLDs de plantes est homologue au domaine C2, impliqué dans leur interaction Ca<sup>2+</sup>-dépendante avec la membrane. Afin d'évaluer l'impact d'un tel clivage, les domaines C2 de l'AtPLD $\alpha$  mais également de l'AtPLD $\beta$ , à titre de comparaison, ont été étudiés sous leur forme entière ou mature. Ainsi, la caractérisation de leur affinité pour les phospholipides, associée à leur modélisation tridimensionnelle, a permis de démontrer que les différences de régulation par le Ca<sup>2+</sup>, observées entre les formes entières et mature, provenaient de la présence d'une hélice  $\alpha$  amphipathique, retirée lors du processus de maturation. Le second axe concerne le développement d'une nouvelle méthode de mesure des activités PLD via le dosage de manière direct, spécifique et continu du PA grâce à la propriété d'amplification de fluorescence par chélation de la 8-hydroxyquinoline, en présence de Ca<sup>2+</sup>. Ainsi, ce test apparaît adapté pour le suivi de l'inhibition des PLDs et pour l'étude de leur spécificité de substrat, en utilisant des phospholipides naturels avec différentes têtes polaires, et à l'échelle d'une microplaque.

Biochemical characterization of phospholipases D and their functional domains. Novel method for measuring phospholipase D activities.

Phospholipase D (PLD) hydrolyses membrane phospholipids, leading to the formation of a free polar headgroup and phosphatidic acid, involved in cell signaling. To understand the biochemical properties of PLDs, this work has been made around two axes. The first one concerns the recombinant expression and purification of the PLD $\alpha$  of *Arabidopsis thaliana* (AtPLD $\alpha$ ) in the yeast *Pichia pastoris*. The N-terminal sequence of the recombinant AtPLD $\alpha$  has been determined and found to lack its first 35 amino acids, suggesting the involvement of a maturing mechanism. However, plant PLDs exhibit a C2-lipid binding domain at their N-terminal region, which is involved in their Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane targeting. Thus, to assess the impact of such a cleavage, whole and mature-like C2 domains of AtPLD $\alpha$ , as well as of AtPLD $\beta$  for the sake of comparison, were studied. Thus, the characterization of their affinity for phospholipids, combined with their three-dimensional modeling have demonstrated that the differences in their regulation by Ca<sup>2+</sup>, observed between whole and mature-like forms, originated from the presence of a N-terminus amphipathic  $\alpha$  helix, removed during the maturation process. The second axis, concerns the development of a novel PLD assay that measure PA in a direct, specific and continuous manner, using the chelation enhanced fluorescence property of 8-hydroxyquinoline in the presence of Ca<sup>2+</sup>. Thus, this assay appears suitable to monitor both the inhibition of PLDs as well as their substrate specificity, using natural phospholipids with different polar headgroups, and at a microplate scale.