

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **02 juillet 2025**

Nom de famille et prénom de l'auteur. e : **Monsieur Zongze WU**

Titre de la thèse : Caractérisation biochimique d'une nouvelle phospholipase D recombinante de *Dechloromonas aromatica* RCB avec une spécificité de substrat inhabituelle

Résumé



La phospholipase D (PLD) catalyse l'hydrolyse de la liaison phosphodiester distale des phospholipides (PLs), et génère de l'acide phosphatidique (PA) et une tête polaire. En plus de cette réaction d'hydrolyse, la PLD est capable de catalyser une réaction de transphosphatidylatation dans laquelle un alcool primaire est transféré sur la partie phosphatidyle, formant ainsi un nouveau PL. La PLD est impliquée dans diverses fonctions chez les êtres vivants, comme la signalisation cellulaire, la tumorigenèse, l'infection, ou la pollinisation chez les plantes. Au cours d'une recherche de PLD de type végétale, deux homologues proches (appelés DaPLD1 et DaPLD2) de la PLD α d'*Arabidopsis thaliana* ont été repérés chez la bactérie *Dechloromonas aromatica* RCB. L'alignement des séquences de DaPLD1 et de la PLD α a montré 19% d'identité peptidique et 30% de similarité, principalement autour des deux motifs catalytiques HKD. DaPLD1 a été amplifié à partir d'ADN génomique, cloné dans le vecteur pET28b et exprimé chez *E. coli*. DaPLD1 a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité suivie d'une filtration sur gel. Les propriétés enzymatiques de DaPLD1 ont ensuite été analysées à l'aide d'une méthode colorimétrique pour détecter la choline libérée à partir de la phosphatidylcholine (PC), et d'une méthode fluorescente basée sur la chélation du PA généré, en présence de Ca²⁺ et d'une sonde, la 8-hydroxyquinoline. DaPLD1 est une PLD Ca²⁺-indépendante. Le pH et la température optimaux sont respectivement de 6 et 30°C. DaPLD1 a une nette préférence pour la phosphatidyléthanolamine (PE) par rapport à tous les autres PLs (PC, phosphatidylglycérol (PG), etc.) comparé à la PLD α végétale de *Vigna unguiculata* et à la PLD bactérienne de *Streptomyces chromofuscus*. Ces trois PLD ont une préférence pour la PE avec des chaînes acyles insaturées en positions sn-1 et sn-2. L'insaturation de la chaîne acyle est importante également pour l'hydrolyse de la PC. De plus, le vanadate (inhibiteur connu des PLD) et l'éthanol (pouvant rentrer en compétition avec l'eau dans la réaction de transphosphatidylatation) sont capables d'inhiber DaPLD1 avec une IC50 respective de 8,5 μ M et 15% (v/v). Des mutations de DaPLD1 ont été réalisées sur des résidus conservés et partagés par les PLD de plantes, mammifères et bactéries: la protéine avec la mutation G466A est active, tandis que celle avec la mutation K164A est inactive, démontrant que le résidu

G466 n'est pas important pour l'activité catalytique, alors que le résidu K164 l'est. La fluorescence et l'analyse par spectrométrie de masse (MS) montrent que DaPLD1 n'a aucune activité de transphosphatidylation détectable sur PE en présence d'éthanol, ou sur PG en présence d'éthanolamine. Cependant, DaPLD1 a une faible activité de transphosphatidylation sur PE en présence de glycérol. Des profils lipidiques de *D. aromatica* RCB et *E. coli* exprimant DaPLD1 ont été réalisés et un phénotype d'*E. coli* exprimant DaPLD1 à différentes températures a été observé. L'analyse quantitative par MS a montré qu'il y avait moins de PG et de PE dans les cellules exprimant DaPLD1 par rapport au témoin, cependant, beaucoup de PA y a été détecté. La protéine DaPLD1 recombinante est ainsi également active *in vivo* chez *E. coli*. En conclusion, l'enzyme DaPLD1 bactérienne est Ca²⁺-indépendante, et a une forte préférence pour la PE comportant des chaînes acyles insaturées. L'expression de DaPLD1 chez *E. coli* entraîne des changements drastiques dans la composition des PLs, avec accumulation de PA et réduction de PE et de PG. Des expériences de cristallisation de cette PLD hétérodoxe sont en cours pour comprendre les caractéristiques moléculaires de sa spécificité de substrat. Un homologue de DaPLD1, DaPLD2, également identifié dans *D. aromatica* RCB, a également été exprimé de manière recombinante et est actif sur la PE. Ses propriétés enzymatiques seront comparées à celles de DaPLD1.

Mots Phospholipase D, *Dechloromonas*

- *aromatica*, Transphosphatidylation, Phosphatidylcholine, Phosphatidyléthanolamine, Acides
clés : de phosphatidique