



**HAL**  
open science

**Rôle de l'interaction entre la septine 9 et les phosphoinositides dans la morphologie de l'appareil Golgi et la régulation des gouttelettes lipidiques : Conséquence dans l'infection par le VHC**

Mohyeddine Omrane

► **To cite this version:**

Mohyeddine Omrane. Rôle de l'interaction entre la septine 9 et les phosphoinositides dans la morphologie de l'appareil Golgi et la régulation des gouttelettes lipidiques : Conséquence dans l'infection par le VHC. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS172 . tel-03214565

**HAL Id: tel-03214565**

**<https://theses.hal.science/tel-03214565v1>**

Submitted on 2 May 2021

**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.

NNT :2016SACLS172



# THESE DE DOCTORAT

de

**L'UNIVERSITÉ PARIS SACLAY**

**Préparée à l'université Paris Sud**

Ecole Doctorale n° 582

CBMS Cancérologie : biologie - médecine - santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Par**

**Mohyeddine OMRANE**

**Rôle de l'interaction entre la septine 9 et les phosphoinositides dans la morphologie de l'appareil Golgi et la régulation des gouttelettes lipidiques : Conséquence dans l'infection par le VHC**

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 07/07/2016

## Composition du jury :

Président du jury :	Didier Samuel	PU-PH(CHB, Hôpital Paul Brousse)
Directrice de thèse :	Ama Gassama-Diagne	Dr, HDR (CHB, Hôpital Paul Brousse)
Rapporteurs :	Jean Dubuisson	Pr. (Institut Pasteur Lille)
	Nathalie Sauvonnnet	Dr, HDR. (Institut Pasteur Paris)
Examineurs :	Bruno Goud	Pr. (Institut Curie)
	Hélène Tronchère	Dr, HDR.(Université Paul Sabatier, Toulouse)



## 1. Résumé

**Rôle de l'interaction entre la septine 9 et les phosphoinositides dans la morphologie de l'appareil Golgi et la régulation des gouttelettes lipidiques : Conséquence dans l'infection par le VHC.**

**Mots clés : Septines, Phosphoinositides-5-phosphate, HCV, Gouttelettes lipidiques.**

Les septines sont une famille des protéines GTPases qui peuvent former des structures d'ordre supérieur, comme les filaments et les anneaux, et capables de lier les membranes cellulaires par leur interaction avec les phosphoinositides via un domaine polybasique en N-terminal de leur domaine de liaison au GTP. Nous avons montré que la septine 9 lie le phosphoinositides-5-phosphate pour s'assembler et induire l'accumulation des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées par le VHC en favorisant la synthèse des triacylglycérols. Nos résultats montrent, ainsi, que la septine 9 est nécessaire pour la réplication du VHC. Une analyse transcriptomique réalisée en utilisant les données GSE14323a a révélé une surexpression significative de la septine 9 dans la cirrhose induite par le VHC. De plus, nous avons montré que la septine 9 est impliquée dans la régulation de la morphologie de l'appareil Golgi et la mise en place de la polarité cellulaire par son interaction avec les phosphoinositides via deux domaines polybasiques. Ces résultats apportent une nouvelle compréhension du mécanisme moléculaire de l'interaction des septines avec les phosphoinositides et montrent pour la première fois l'importance de cette interaction dans des fonctions cellulaires de la septine 9.

### Abstract:

**Role of septin 9 interaction with the phosphoinositides in Golgi apparatus morphology and lipid droplets regulation: consequences in HCV infection**

**KEYWORDS : Septins, Phosphoinositides-5-phosphate, HCV, Lipid droplets.**

Septins belongs to the GTPases protein family that can form high order structures such as filaments and rings, and are able to bind cell membranes by interacting with phosphoinositides via a polybasic domain located at the N-terminal of their GTP binding domain. Here, we show that septin 9 binds to phosphoinositide-5-phosphate to assemble and induce the accumulation of lipid droplets by promoting triglyceride synthesis in HCV infected cells. Our findings show that septin 9 is required for HCV replication and a transcriptomic analysis performed using the GSE14323 dataset revealed a significant upregulation of septin 9 in HCV-induced cirrhosis. In addition, we have shown that the septin 9 was involved in the Golgi apparatus morphology regulation and cell polarity installation by interacting with phosphoinositides via two polybasic domains. These results provide new understanding of the molecular mechanism of septin interactions with phosphoinositides and show for the first time the importance of this interaction in septin 9 cellular functions.



*Je dédie cette thèse :*

*À ma chère femme qui tient une place immense dans mon cœur. Merci d'avoir beaucoup patienté, supporté toutes les difficultés de la vie et consacré tout ton temps pour t'occuper de moi et nos deux enfants. Rahaf, ma belle, j'ai eu le bonheur de t'épouser pendant ma thèse, et ceci m'a permis de supporter plus facilement les difficultés rencontrées au cours d'un doctorat (et je ne sais pas si j'y serai arrivé sans toi). Merci de m'avoir encouragé à me dépasser chaque jour, et d'avoir supporté mes horaires aussi chargés au labo et les soirées si courtes ensemble. Tu as fait beaucoup de sacrifices pour que je réussisse et voilà finalement c'est le moment de récolte et il est évident que sans toi je n'y serais pas arrivé.*

*À mes chers parents qui m'ont encouragé, soutenu et supporté pendant ces longues années d'études jusqu'à aujourd'hui.*

*À mes chers frères et ma chère sœur, vous étiez toujours à mes côtés, spécialement mon frère Mazen qui m'a beaucoup soutenu financièrement et moralement.*

*À ma belle mère, ma belle sœur et mon frère Ayman pour leurs encouragements, leur compréhension et leur bonne humeur.*

*À ma tante Amneh qui m'a toujours considéré comme son fils, m'a beaucoup encouragé et soutenu.*



## إهداء

الحمد لله الذي بفضلته تتم الصالحات

باسم الخالق الذي أضاء الكون بنوره البهي، وحده أعبد و له أسجد خاشعاً شاكراً لنعمته و فضله علي في إتمام هذا العمل.

إلى صاحب الفردوس الأعلى و سراج الأمة المنير و شفيعها النذير البشير محمد ( صلى الله عليه و سلم ) فخرأ و اعتزازأ.

إلى زوجتي الغالية رHF التي ملكت زمام قلبي و ملأته حباً و حناناً. شكراً لصبرك، لتحملك كل مصاعب الحياة و لتكريسك جل وقتك للعناية بي و بولدينا. رHF، يا جميلتي، لقد سعدت بزواجي بك خلال تحضيري لرسالة الدكتوراة و لأريب بان ذلك قد ساعدني على تحمل كل الصعوبات خلال تلك الفترة. و ما كنت لأتحملها دونك. شكراً لتشجيعك لي كل يوم. شكراً لتحملك غيابي الطويل في المختبر و للأوقات القصيرة التي قضيناها معاً كل مساء. لقد قدمتي الكثير من التضحيات في سبيل نجاحي و هاهي لحظة القطاف قد دننت و لكن من المؤكد ما كنت لأصل لها من دونك.

إلى والدي الغاليين اللذان ما فتئاً يشجعاني يدعماني و يقفان إلى جانبي في كل المواقف و الأزمات خلال سنوات دراستي الطويلة حتى هذا اليوم. شكراً لحبكما الذي أعطيتم، لتضحياتكم الكثيرة التي قدمتم، لكل الجهد و العمل الذي قمتم و مازلتم تقومون به حتى هذا اليوم. أشكركم لحسن تربيتكم و إعدادكم لي رغم كل صعوبات الحياة و مشاكلها. ابي الغالي، امي الحنون لا شيء في هذه الدنيا كاف لوفاء حقكما علي. جزاكما الله عني كل خير و أجزل عطائه لكما و اسدل عليكما نسائم رحمته و مغفرته.

إلى اخوتي و اختي الغالية كنتم دائماً إلى جانبي داعمين لي وأخص بالذكر أخي مازن الذي دعمني مالياً و معنوياً خلال الفترة الأخيرة.

إلى حماتي الغالية و بناتها و أخي الغالي ايمن شكراً لتشجيعكم و تفهمكم و دعمكم الذي رفع معنوياتي في كثير من الأوقات.

إلى عمتي الحنون آمنة لقد كنت دائماً كابن لك. شكراً لتشجيعك و عطفك و دعمك لي.



## **2. Remerciements**

En premier lieu, je tiens sincèrement à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean Dubuisson et le Docteur Nathalie Sauvonnnet d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je souhaite également remercier les autres membres du jury, le Professeur Bruno Goud et le Docteur Hélène Tronchère, d'avoir accepté d'être examinateurs du travail présenté dans ce mémoire.

Ensuite, je souhaite témoigner toute ma gratitude au Docteur Ama Gassama-Diagne, ma directrice de thèse pour laquelle je suis infiniment reconnaissant, pour son excellent encadrement et sa grande disponibilité et le fait de m'avoir toujours encouragé et donné les moyens pour réaliser ce travail de recherche.

J'aimerais remercier le Professeur Didier Samuel, directeur de l'unité de recherche 1193 qui m'a permis d'intégrer son laboratoire.

Je tiens également à remercier le Professeur Christian Bréchet, le co-directeur de laboratoire pour ses discussions scientifiques.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Marie-Françoise Bourgeade pour son aide précieuse dans la correction linguistique et scientifique de ce manuscrit.

J'aimerais remercier le Professeur Christian Poüs pour sa véritable aide et ses conseils scientifiques pour réaliser la deuxième partie des résultats.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Stéphane Bressanelli pour son aide dans la modélisation moléculaire et pour ses conseils scientifiques.

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont participé directement à ce travail de thèse. Je remercie spécialement ma collègue Juan Peng, une doctorante sérieuse et rigoureuse. J'étais ravi de partager le travail avec elle et je lui souhaite bon courage pour la suite.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire pour leur aide, leur écoute et leurs véritables conseils.



### **3. Table des matières :**

<b>1. <u>Résumé</u></b>	2
<b>2. <u>Remerciements</u></b>	5
<b>3. <u>Table des matières</u></b>	6
<b>4. <u>Liste des abréviations</u></b>	13
<b>5. <u>Liste des figures</u></b>	16
<b>6. <u>AVANT-PROPOS</u></b>	18
<b>7. <u>Introduction</u></b>	20
<b>7.1. Les septines</b>	20
<b>7.1.1. Les septines humaines</b>	22
<b>7.1.2. Les domaines des septines</b>	23
<b>Le domaine liant le GTP</b>	24
<b>Le domaine polybasique (PB)</b>	24
<b>Le domaine riche en proline</b>	25
<b>L'élément unique des septines (SUE)</b>	25
<b>Le domaine en superhélice (coil coiled )</b>	25
<b>7.1.3. Complexes de septines</b>	26
<b>Les complexes des septines chez les levures</b>	26
<b>Les complexes des septines chez les mammifères</b>	27
❖ <b>Les complexes hexamériques des septines</b>	27
❖ <b>Les complexes octamériques des septines</b>	29
<b>7.1.4. Les structures d'ordre supérieur des septines</b>	31
<b>7.1.5. Régulation de l'assemblage des septines</b>	32
<b>Régulation par le GTP/GDP</b>	32
<b>Régulation par Cdc42 et Rho</b>	33

<b>Régulation par l'anilline et la myosine II</b>	34
<b>Régulation des septines par des modifications post-traductionnelles</b>	34
❖ SUMOylation	34
❖ Acétylation	34
❖ Phosphorylation	35
<b>7.1.6. Les rôles moléculaires des septines</b>	36
<b>Septines comme des protéines d'échafaudage</b>	36
<b>Les barrières de diffusion des septines</b>	37
<b>Régulation de la dynamique des microtubules</b>	37
<b>Organisation des membranes et la rigidité corticale</b>	39
<b>7.1.7. Les processus cellulaires impliquant les septines</b>	39
<b>La division cellulaire</b>	39
❖ <b>Division cellulaire chez les levures</b>	39
▪ La spécification de lieu de bourgeonnement	39
▪ La croissance polarisée des bourgeons	40
▪ La régulation des points de contrôle du cycle cellulaire	40
❖ <b>La division cellulaire chez les mammifères</b>	40
▪ La ségrégation des chromosomes	40
▪ L'organisation du sillon de clivage	41
▪ La cytokinèse chez les mammifères	41
▪ La régulation de la réponse aux dommages de l'ADN	41
<b>La polarité cellulaire</b>	42
❖ <b>L'établissement de la polarité cellulaire dans les levures bourgeonnantes</b>	42
❖ <b>L'établissement de la polarité cellulaire dans les cellules de mammifères</b>	42
<b>Le trafic vésiculaire</b>	43

<b>La régulation des cils</b>	46
<b>7.1.8. Maladies associées aux septines</b>	46
<b>L'amyotrophie névralgique héréditaire (ANH)</b>	46
<b>La stérilité mâle</b>	47
<b>Le cancer</b>	47
❖ <b>Les cancers associés aux septines</b>	48
▪ La leucémie	48
▪ Le lymphome	48
▪ Le cancer colorectal	48
▪ Les cancers de sein et des ovaires	48
▪ Le carcinome épidermoïde de la tête et du cou	48
❖ <b>Liens mécanistiques possibles entre les septines et le cancer</b>	49
▪ Aneuploïdie	49
▪ Métastase	49
▪ Angiogenèse	49
▪ Apoptose	50
<b>Les maladies infectieuses</b>	50
❖ <b>L'infection par des pathogènes bactériens</b>	50
❖ <b>L'infection par <i>Candida albicans</i> (<i>C. albicans</i>)</b>	51
❖ <b>L'infection par VHC</b>	52
<b>7.1.9. La Septine 9</b>	52
<b>7.2. <u>Les phosphoinositides</u></b>	54
<b>7.2.1. Les phosphoinositides et leurs fonctions cellulaires</b>	55
<b>PtdIns3P</b>	55
<b>PtdIns4P</b>	55
<b>PtdIns5P</b>	56
<b>PtdIns(3,4)P2</b>	58

PtdIns(3.5)P2	59
PtdIns(4.5)P2	60
PtdIns(3.4.5)P3	60
<b>7.2.2. Régulation des septines par les phosphoinositides</b>	61
<b>7.3. <u>Le trafic intracellulaire</u></b>	62
<b>7.3.1. Les organites membranaires des cellules eucaryotes</b>	62
<b>7.3.2. Les différents types de transport dans la cellule eucaryote</b>	63
Le transport des protéines via les pores nucléaires ( <i>gated transport</i> )	63
Le transport transmembranaire	63
Le transport vésiculaire	63
<b>7.3.3. Les compartiments intracellulaires, le transport vésiculaire et les modèles de trafic cellulaire</b>	64
Le réticulum endoplasmique (ER)	65
Le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC)	66
L'appareil de Golgi	67
Le réseau trans-Golgien	67
Les endosomes, MVB, les lysosomes	68
<b>7.3.4. Le transport à travers l'appareil de Golgi</b>	69
Le modèle des compartiments stables	70
Le modèle progression / maturation des citernes	70
Le modèle de progression / maturation des citernes avec le transport tubulaire hétérotypique	70
Le modèle de distribution rapide dans un appareil de Golgi mixte	70
Le modèle de transport régulé par la conversion de Rab	71
<b>7.3.5. Le rôle des petites protéines G dans le trafic intracellulaire</b>	71

<b>7.4. <u>La régulation de la morphologie de l'appareil Golgi</u></b>	74
<b>7.4.1. L'appareil Golgi pendant le cycle cellulaire</b>	74
L'appareil Golgi au cours de l'interphase	76
❖ Rôle des protéines de matricegolgiennes	76
❖ Rôle des microtubules dans la régulation du Golgi au cours de l'interphase	77
❖ Rôle d'actine dans la régulation de morphologie de l'appareil de Golgi	78
<b>7.4.2. La relation entre l'appareil de Golgi et les centrosomes</b>	78
<b>7.4.3. Impact de la morphologie de l'appareil Golgi sur ses fonctions</b>	79
<b>7.5. <u>Les gouttelettes lipidiques (GLs)</u></b>	80
<b>7.5.1. Structure</b>	80
Le cœur lipidique	80
La monocouche phospholipidique	80
Les protéines associées	80
Les protéines associées aux GLs dans les cellules hépatiques	81
❖ Les protéines associées aux GLs dans les cellules hépatiques	81
❖ Le ciblage des protéines aux GLs	81
<b>7.5.2. La formation des GLs</b>	82
<b>7.5.3. La régulation des GLs</b>	83
L'augmentation de taille	83
La lipolyse et la dégradation des GLs	84
La mobilité des GLs	85
<b>7.5.4. Rôle physiologique des GLs</b>	85
<b>7.6. <u>Virus de l'hépatite C (VHC)</u></b>	86
<b>7.6.1. Généralités</b>	86
<b>7.6.2. Pathogénèse</b>	86
<b>7.6.3. Variabilité génomique du VHC</b>	87

<b>7.6.4. Traitement de l'hépatite C</b>	88
<b>7.6.5. Les particules virales</b>	89
<b>7.6.6. Structure et organisation du génome</b>	89
<b>7.6.7. Les protéines de VHC</b>	89
<b>Les protéines structurales</b>	90
❖ La protéine de capsid (core)	90
❖ Les glycoprotéines virales E1 et E2	91
❖ La protéine P7	92
<b>Les protéines non structurales</b>	92
❖ La protéine NS2	92
❖ Le complexe NS3-NS4A	92
❖ La protéine NS4B	93
❖ La protéine NS5A	93
❖ La protéine NS5B	94
<b>7.6.8. Cycle du VHC</b>	95
<b>L'entrée du virus dans la cellule</b>	95
<b>La traduction du génome et le clivage du polypeptide</b>	96
<b>La réplication virale</b>	96
<b>L'assemblage et la sortie des particules virales</b>	96
<b>La maturation du virus</b>	97
<b>7.6.9. Le rôle des GLs dans l'infection par VHC</b>	97
<b>L'accumulation des GLs induite par VHC</b>	99
<b>8. <u>Objectifs des travaux de thèse</u></b>	102
<b>9. <u>Résultats</u></b>	103
<b>I. La septine 9 régule la morphologie de l'appareil Golgi, la sécrétion et la polarité cellulaire par son interaction avec les phosphoinositides par deux domaines polybasiques</b>	103
<b>II. La septine 9 induit la croissance des gouttelettes lipidiques par un mécanisme dépendant du phosphoinositides-5-phosphate et des microtubules mécanisme exploité par le VHC</b>	137

10.	<b><u>Discussion et perspectives</u></b>	203
11.	<b><u>Conclusion finale</u></b>	211
12.	<b><u>Références</u></b>	212



## **4. Liste des abréviations :**

3' NTR : <i>non translated region 3</i> .	DGAT1: <i>diacylglycerol acyltransferase-1</i>
5' NTR : <i>Non translated region 5</i> .	DOK : <i>Downstream of Tyrosine Kinases</i> .
ANH: Amyotrophie névralgique héréditaire.	EC : esters de cholestérol.
AP1,3,4: <i>adaptor protein 1,2,3</i>	EGFR : <i>Epidermal growth factor receptor</i> .
ARFP : Alternatif Reading Frame Protein.	ENTH: Epsin N-terminal homology.
ATG : <i>Autophagy related proteins</i>	ERAD : <i>ER- associated degradation</i> .
ATG5: <i>autophagy-related 5</i>	ERK1,2: <i>Extracellular signal Regulated Protein Kinases 1 and 2</i>
ATGL : adipose triglycériide lipase.	FAPP1,2 : <i>four-phosphate-adaptor protein</i>
<i>C. elegans</i> : <i>Caenorhabditis elegans</i> .	FAS : <i>fatty acid synthase</i>
CCV : <i>Clathrin coated vesicles</i>	FERM : 4.1, ezrin, radixin, moiesin.
CDC: <i>Cellular Division Cycle</i>	FIT2 : <i>fat storage-inducing transmembrane proteins 2</i> .
Cdk5: <i>Cyclin-dependent kinase 5</i> .	FoxO1 : <i>forkhead box protein O1</i> .
CENP E: <i>Centromere protein E</i> .	FRAP: Fluorescence après photo blanchiment.
CERT: <i>ceramide transfer protein</i> .	Fsp27 : <i>fat-specific protein 27 kDa</i> .
CHC: Carcinome hépatocellulaire.	G6P : glucose-6-phosphatase.
CIDE : <i>the cell death-inducing DFFA-like effector</i> .	GAGs : glycosaminoglycans.
CLASP : <i>CLIP-associated proteins</i> .	GAPs: <i>GTPase activating proteins</i> .
CLDN1: Claudine 1 .	GDIs : <i>GDP dissociation inhibitors</i> .
COPI : <i>coatamer protein I</i> .	GEF: <i>Guanine nucleotide- exchange factor</i> .
CTP: phosphocholine cytidylyltransferase.	GLs : gouttelettes lipidiques.
DAAs : <i>direct acting antiviral drugs</i> .	GMAP210 : <i>Golgi-associated microtubule binding protein 210</i> .
DAG : Diacylglycérol.	

GRASP : *Golgi reassembly stacking proteins.*

HIF-1  $\alpha$  : *Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ .*

HIG2 : *hypoxia-inducible protein 2.*

HSL : *hormone-sensitive lipase.*

HVR : *Hypervariable regions*

IAP: *inhibitor of apoptosis protein.*

IPGD : *Invasion plasmidic gene D*

IRES: *internal ribosome entry site.*

*L. monocytogenes* : *Listeria monocytogenes.*

MAP4: *Microtubule-associated protein 4.*

MAPK : *mitogen-activated protein kinase .*

MCAD : *medium-chainacyl-CoAdehydrogenase.*

MDCK: *Madin Darby Canine Kidney.*

miR 27 : *microARN27.*

MLL: *Mixed lineage leukemia.*

MVB: *multivesicular bodies.*

NCS-1 : *Neuronal calcium sensor-1*

NDP52: *nuclear dot protein 52 kDa*

NSF: *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*

OCLN : *occludine.*

OSBP : *oxysterol binding protein.*

PB: *Polybasic domain.*

PC : *phosphatidylcholine.*

PE : *phosphatidyléthanolamine.*

PEPCK : *phospho enolpyruvate carboxy kinase.*

PH : *Pleckstrin homology domain.*

PHD : *Plant homeodomain.*

PI3K: *Phosphadidyl-Inositol 3 Kinases*

PI4K : *PtIns-4 kinase.*

PIs: *phosphoinositides.*

PIs: *Phosphoinositides.*

PLC : *phospholipase C .*

PLD: *phospholipase D.*

PNPLA3 : *patanin-like phospholipase domain-containing 3.*

PPAR $\alpha$  : *peroxisomeproliferator-activatedreceptor  $\alpha$ .*

PtdIns: *phosphatidylinositol.*

PX : *Phox Homology.*

RdRp : *RNA-dependent RNA polymerase.*

RE : *réticulum endoplasmique .*

SCAD : *short-chain acyl-CoAdehydrogenase.*

SH3 domaines: *Src homology 3domain.*

SHIP2 : *SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2*

**SIMBI:** *signal recognition particle, MinD and BioD.*

**SNAP:** *Soluble NSF attachment protein.*

**SNAP-25:** *Synaptosome-associated protein of 25 kDa.*

**SNARE:** *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor.*

**SOCS7:** *Suppressor of Cytokine Signaling-7.*

**SP:** *signal peptidase.*

**SPP:** *signal peptide peptidase.*

**SRB1:** *récepteur scavenger membre de la classe B1.*

**SREBP-1c :** *sterol regulatory element binding protein 1c.*

**SUE:** *Septin unique element.*

**SUMO:** *Small ubiquitin-related modifier.*

**TAG :** *triacylglycérol.*

**TAPP:** *Tandem PH (pleckstrin homology)-domain-containing protein*

**TGN:** *Trans Golgi network .*

**TRAPPI :** *transport protein particle I.*

**VAMP:** *Vesicle-associated membrane protein.*



## **5. Liste des figures**

Figure 1: Photographie en microscopie électronique d'un bourgeon de *S. cerevisiae* montrant les filaments des septines au niveau de l'anneau contractile.

Figure 2: L'arbre de vie des eucaryotes montre l'existence des septines dans différents organismes.

Figure 3: Diagramme schématique de la position des septines dans la superclasse boucle P NTPase sur la base des études phylogénétiques.

Figure 4: Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines.

Figure 5: Représentation schématique de l'organisation des domaines des septines.

Figure 6: Complexe des septines de levure et formation des filaments .

Figure 7: Structure du complexe des septines.

Figure 8: Les interactions des septines.

Figure 9 : Schéma illustrant l'assemblage des complexes des septines.

Figure 10 : Les deux types d'assemblage proposés pour la formation de tétramères des septines.

Figure 11 : La formation des structures d'ordre supérieur des septines.

Figure 12 : Les septines pendant le cycle cellulaire de *S.cerevisiae*.

Figure 13 : Représentation schématique du mécanisme moléculaire de l'exocytose de vésicules.

Figure 14 : Présentation schématique de l'exocytose dans les synapses des neurones de souris septin 5<sup>+/+</sup> et septin 5<sup>-/-</sup> .

Figure 15: Représentation schématique de deux mécanismes d'infection bactérienne.

Figure 16 : Structure des transcrits et variants de la septine 9.

Figure 17 : Les phosphoinositides : structure, localisation, métabolisme et physiopathologie.

Figure 18 : Principaux compartiments intracellulaires d'une cellule animale.

Figure 19 : Représentation schématique des types de trafic des protéines dans la cellule.

Figure 20 : Les voies d'exocytose et d'endocytose.

Figure 21: Schéma de l'appareil de Golgi et organisation des intermédiaires du transport de la voie de sécrétion.

Figure 22 : Schéma des différentes étapes des voies de dégradation des protéines dans les cellules de mammifères.

Figure 23 : Représentation schématique de trois modèles de transport à travers l'appareil Golgi.

Figure 24 : Représentation schématique de deux modèles de transport à travers l'appareil Golgi.

Figure 25 : Localisation des cascades de protéines G dans une cellule épithéliale.

Figure 26: L'appareil Golgi pendant le cycle cellulaire.

Figure 27: Localisation des protéines de la matrice du Golgi, les golgines et les GRASPs.

Figure 28 : Structure de la gouttelette lipidique.

Figure 29 : Illustration des hélices amphipathiques et des épingles à cheveux hydrophobes présentes dans des protéines associées aux GLs.

Figure 30 : Prévalence relative de chaque génotype du VHC dans le monde.

Figure 31. Le génome, la polyprotéine du virus de l'hépatite C et ses produits de clivage.

Figure 32 : La structure de la protéine core.

Figure 33 : La structure de la protéine NS5B.

Figure 34 : Le cycle du VHC.

Figure 35 : Les mécanismes possibles responsables de l'accumulation de lipides hépatiques au cours de l'infection par le VHC.

Figure 36 : Le PtdIns(5)P induit la phosphorylation d'ERK pour augmenter la taille des GLs.

Figure 37: septin 9 et PtdIns(5)P régulent le LH intracellulaire.

Figure 38: L'inhibition de l'expression de la septin 9 induit la fragmentation de Golgi et l'accumulation de LH.

## **6. AVANT-PROPOS**

Malgré les énormes progrès réalisés pour éradiquer le virus de l'hépatite C (VHC) chez les patients infectés, ce virus reste un grand problème mondial de santé. L'infection par le VHC est toujours responsable d'environ un quart des cas de cirrhose et de cancer du foie à travers le monde, et de 500.000 décès par an. Cette mortalité élevée est susceptible d'augmenter au cours des 20 prochaines années à cause de la vaste population infectée dans les pays en cours de développement et des coûts très élevés des traitements. Le besoin de nouvelles stratégies de traitement efficaces et moins chers est toujours primordial.

Au sein de l'unité Inserm 1193, Physiopathogénèse et Traitement des Maladies du Foie, la septine 9 a été identifiée comme une protéine dérégulée dans le cancer du foie chez des patients infectés par le VHC.

La septine 9 est une protéine de la famille des septines possédant des propriétés GTPases. Les septines sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la division, la polarité cellulaire et le trafic vésiculaire. Les septines sont connues pour se lier d'une part au cytosquelette et d'autre part aux membranes cellulaires par leur interaction avec les phosphoinositides (PIs). Plusieurs études ont montré l'interaction des septines avec les PIs mais l'implication de cette interaction dans les fonctions cellulaires des septines reste mal comprise.

L'investigation des rôles moléculaires de la septine 9 dans la pathogénèse du VHC et le développement du cancer de foie représente un des axes de recherche du groupe de la polarité cellulaire et hépatite virale et cancer dirigé par Dr. Ama Gassama-Diagne.

L'objectif du projet de ma thèse a été d'explorer le rôle de la septine 9 et son interaction avec les phosphoinositides dans le pathogénèse du VHC, dans le transport intracellulaire et la polarité cellulaire.

L'introduction de cette thèse détaillera les connaissances actuelles des septines et de leurs partenaires de liaison, les phosphoinositides, puis introduira brièvement le trafic intracellulaire et la régulation de la morphologie de l'appareil Golgi ainsi que les connaissances sur le VHC et les gouttelettes lipidiques (GLs).

Les résultats de ce travail sont divisés en deux parties

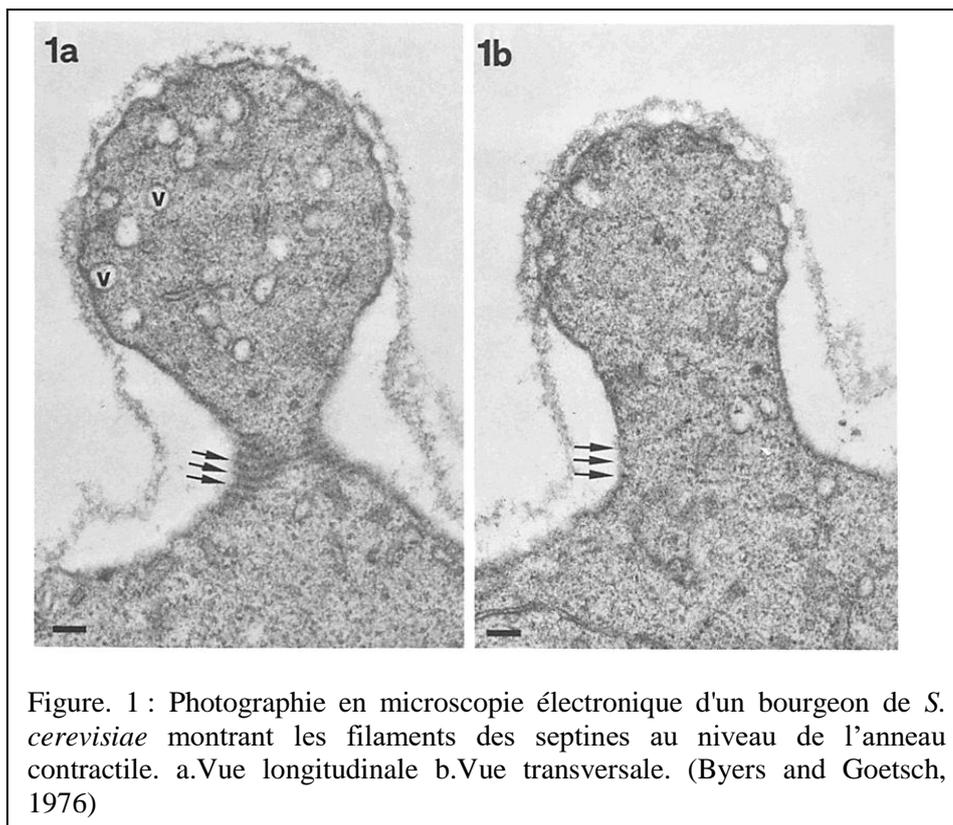
La première partie concerne l'étude de l'interaction de la septine 9 avec les phosphoinositides et l'importance de cette liaison pour le trafic intracellulaire et la polarité cellulaire.

La deuxième partie concerne le rôle de la septine 9 dans l'infection par le VHC. Cette étude a permis de mettre en évidence l'implication de la septine 9 dans la réplication de ce virus ainsi que l'implication de la septine 9 et son partenaire de liaison le phosphoinositide 5 phosphate (PtdIns5P) dans la régulation des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées ou non par le VHC.

## 7. Introduction :

### 7.1. Les septines

Les septines ont été caractérisées pour la première fois dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Dans un travail étudiant les protéines clés impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, Hartwell et ses collègues ont identifié un sous-groupe des gènes CDC (cycle de division cellulaire) essentiels pour la progression de la cytokinèse et défini le rôle spécifique de quatre gènes: CDC3, CDC10, CDC11 et CDC12 (Hartwell, 1971). Des mutations au niveau d'un de ces quatre gènes causent un arrêt du cycle cellulaire et des défauts de croissance des bourgeons et de la cytokinèse. Ces gènes codent pour des protéines capables de former un anneau composé de filaments très ordonnés (Figure 1), d'environ 10 nm de diamètre, positionné à la base du bourgeon dès son émergence et qui disparaît au début de la cytokinèse (Byers and Goetsch, 1976).



A cause de leur localisation dans la paroi transversale de la levure au cours de la division cellulaire (septum) cette nouvelle famille de protéines a été nommée septine (Pringle, 2008).

L'analyse phylogénétique des septines montre qu'elles sont retrouvées dans des champignons, des animaux, des protistes, mais pas dans les plantes (Pan et al., 2007)(Nishihama et al., 2011) ( Figure 2).

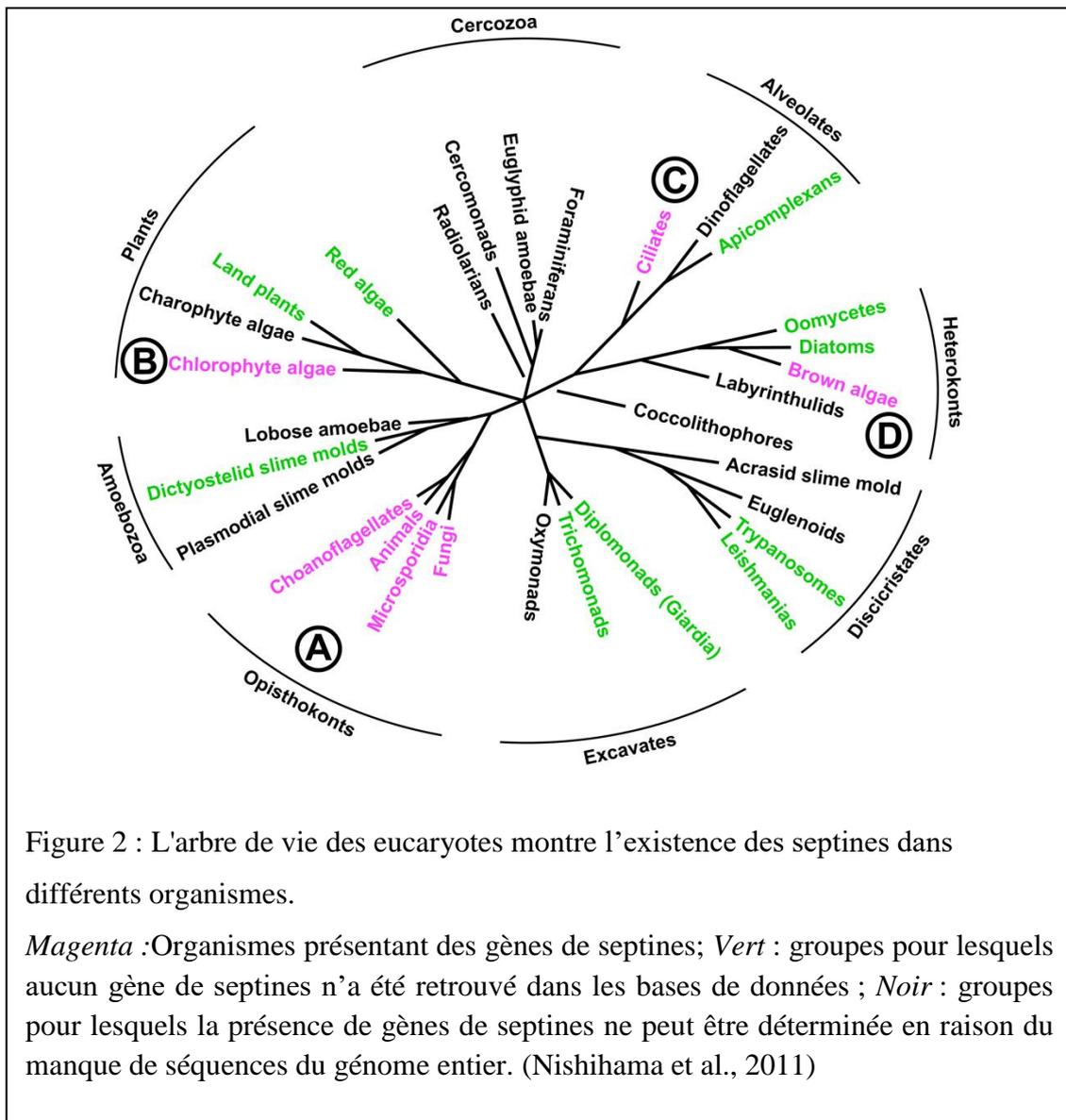
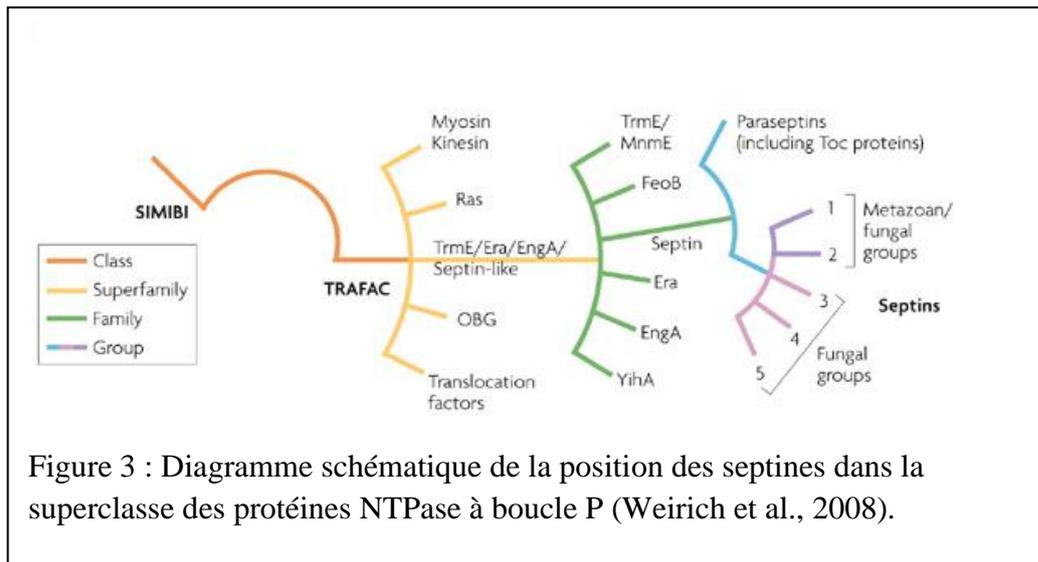


Figure 2 : L'arbre de vie des eucaryotes montre l'existence des septines dans différents organismes.

*Magenta* : Organismes présentant des gènes de septines; *Vert* : groupes pour lesquels aucun gène de septines n'a été retrouvé dans les bases de données ; *Noir* : groupes pour lesquels la présence de gènes de septines ne peut être déterminée en raison du manque de séquences du génome entier. (Nishihama et al., 2011)

Les septines sont des protéines GTPases. Elles ont été classées évolutivement dans la branche phylogénétique des NTPases à boucles-P, incluant la superfamille de moteurs du cytosquelette myosine/kinésine et la superfamille de GTPases Ras (Leipe et al., 2002)(Weirich et al., 2008). Les septines sont divisées en cinq groupes possédant une orthologie entre les règnes: Le Groupe 1 (qui inclut Cdc10p de *S. cerevisiae* et la septine 9 humaine) et le groupe 2 (qui comprend Cdc3p de *S. cerevisiae* et la septine 7 humaine). Ces deux groupes sont aussi retrouvés chez de champignons et les animaux. Le groupe 3 (qui

comprend Cdc11p de *S. cerevisiae*) et le groupe 4 (qui inclut Cdc12p de *S. cerevisiae*) sont retrouvés chez les champignons et les microsporidies. Le groupe 5 (qui comprend Aspe de *Aspergillus nidulans*) n'est retrouvé que chez des champignons filamenteux (Pan et al., 2007) (Figure 3).



Le nombre des septines varie entre les organismes (Nguyen et al., 2000), (Kinoshita, 2003). Par exemple, *Caenorhabditis elegans* (*c.elegans*) exprime deux septines (UNC-59) et UNC-61), *Saccharomyces cerevisiae* exprime sept septines (CDC10, CDC3, CDC11, CDC12, Shs1, SPR3 et Spr28), CDC3, CDC10, Cdc11, CDC12 et Shs1 sont exprimés pendant la croissance végétative, tandis que Spr3 et Spr28 sont spécifiques de la sporulation. Chez les mammifères, la plupart des septines sont exprimées d'une manière tissu spécifique (Fung et al., 2014). Les humains expriment 13 septines (septines 1-12 et 14).

### 7.1.1. Les septines humaines :

Le génome humain contient 14 gènes des septines dont 13 sont traduits en protéine (septine1à12 et septin14). Ces protéines sont regroupées en quatre sous-groupes majeurs sur la base de leur homologie de séquence (Peterson and Petty, 2010) (Figure 4) :

- Sous groupe de septine 2 qui contient les septine 1, septine 2, septine 4, septine 5
- Sous groupe de septine 6 qui contient les septine 6, septine 8, septine 10, septine 11, septine 14
- Sous groupe de septine 3 qui contient septine 3, septine 9, septine 12
- Sous groupe de septine 7 qui contient un seul membre, la septine 7

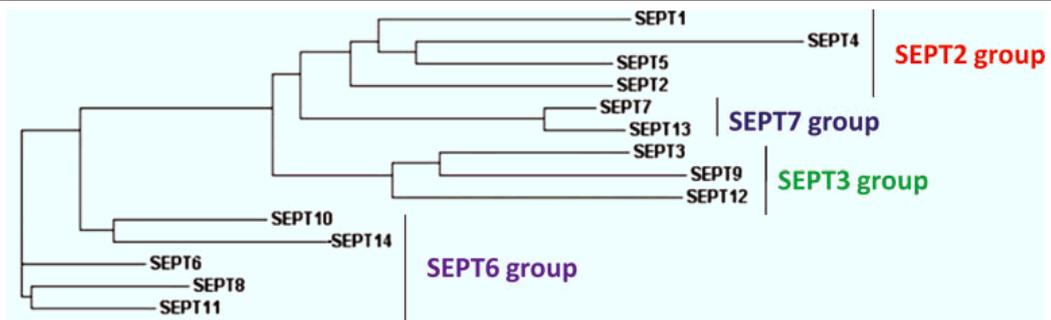


Figure 4 : Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines. L'arbre illustre la relation phylogénétique entre les membres de la famille déterminée par l'analyse Clustal W (Peterson and Petty, 2010).

### 7.1.2. Les domaines des septines

Toutes les septines contiennent un domaine central conservé liant le GTP (Leipe et al., 2002) et, du côté N-terminal le domaine polybasique (PB) constitué des résidus basiques impliqués dans l'interaction des septines avec les phosphoinositides (Casamayor and Snyder, 2003)(Zhang et al., 1999). Du côté C-terminal, se trouve l'élément unique de septine qui est impliqué dans la formation des filaments des septines (Sirajuddin et al., 2007)(Sirajuddin et al., 2009). Le reste de la protéine est composé de régions N- terminale et C-terminale variables en taille, qui peuvent contenir un domaine riche en proline et un domaine de super hélices (*coil coiled*), respectivement. Les régions N- et C-terminales jouent un rôle essentiel dans les interactions septine-septine (DeMay et al., 2011)(Weirich et al., 2008) (Figure 5).

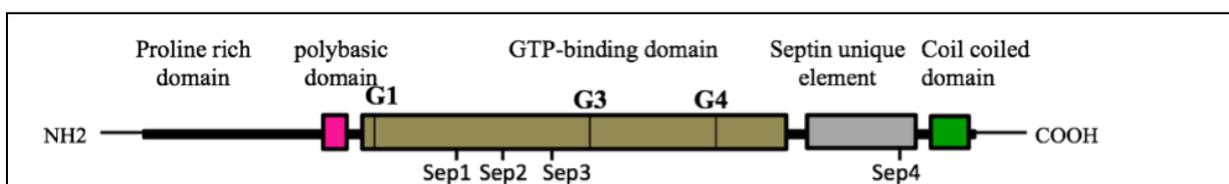


Figure 5 : représentation schématique de l'organisation des domaines des septines

Les septines contiennent :

- Le domaine conservé de liaison au GTP qui comprend trois motifs: G1, GxxxxGK ; G3, DxxG et G4, xKxD .
  - Le domaine polybasique (rose)
  - L'élément unique de la septine(gris).
  - De nombreuses septines ont également un domaine coiled-coil à l'extrémité C-terminale.
- Les sep1-4 sont les motifs des septines identifiés par PAN et al., 2007.

### ➤ **Le domaine de liaison au GTP**

Toutes les protéines GTPases à boucle-P partagent cinq motifs conservés désignés G1 à G5 dans le domaine de liaison au GTP (Bourne et al., 1991).

- Le motif G1, défini par l'élément consensus GxxxxGK, forme une boucle flexible qui interagit avec le groupe phosphate du nucléotide (Saraste et al., 1990).
- Le motif de G2 est conservé au sein des différentes familles de GTPases, mais pas sur l'ensemble de la classe (Bourne et al., 1991)(Bourne et al., 1991).
- Le motif G3 contient plusieurs résidus hydrophobes suivis par DxxG. Cette région lie le  $Mg^{2+}$  et peut interagir avec les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de GTP.
- Le motif G4, NKxD, est important pour la spécificité de liaison GTP (Leipe et al., 2002).
- Le motif G5 se
- trouve dans certains membres de la classe des protéines GTPases à boucle-P(Saraste et al., 1990).

Les septines contiennent les motifs G1, G3 et G4 mais elles diffèrent de la plupart des GTPases par l'absence d'une asparagine en position 1 du motif G4 (AKAD ou GKAD au lieu de NKXD) (Pan et al., 2007)(Nishihama et al., 2011) (figure 5). Le rôle du GTP et du GDP dans la fonction et l'assemblage de filaments des septines est encore mal connu. Les expériences montrent que la présence de GTP régule les positions des motifs structuraux dans les domaines appelés commutateurs (en anglais *switches*) de liaison au GTP. Les différents changements conformationnels dus aux GTP / GDP pourraient être nécessaires pour la formation de complexes stables des septines et pour leur dissociation au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Sirajuddin et al., 2009)(Weirich et al., 2008).

### ➤ **Le domaine polybasique (PB)**

Ce domaine, localisé près du motif G1 du côté N-terminal, est impliqué dans l'interaction septine-phosphoinositides (Casamayor and Snyder, 2003), (Zhang et al., 1999).

Bien qu'environ les deux tiers des septines chez les eucaryotes opisthocontes (champignons, microsporidies, choanoflagellés et animaux) contiennent un domaine PB situé dans la partie N-terminale du motif G1 (Pan et al., 2007), ce domaine est absent dans toutes les septines chez les eucaryotes non-opisthocontes (algues chlorophytes, algues brunes, et

ciliés ) avec des exceptions chez les algues chlorophytes (Nishihama et al., 2011). Récemment, il a été montré que le domaine PB de la septine 9 se lie sur la F-actine par trois sites dont deux correspondraient aux sites de liaison de la myosine et cofiline qui sont des molécules impliquées dans la dépolymérisation des filaments d'actine. Ces résultats suggèrent donc que la septine 9 pourrait par sa liaison sur la F-actine, empêcher celles de la cofiline et de la myosine afin de maintenir l'intégrité des filaments d'actine (Smith et al., 2015).

➤ **Le domaine riche en proline**

Plusieurs septines humaines contiennent un domaine riche en proline près de la région N-terminale. Bien qu'il n'y ait pas d'études spécifiques dédiées à la compréhension du rôle fonctionnel lié à ce domaine, l'hypothèse est qu'il pourrait être essentiel pour les interactions protéine-protéine, par exemple, l'interaction avec des protéines contenant des domaines SH3 (*SRC homology 3 domain*) (Lim and Richards, 1994).

➤ **L'élément unique de septine (SUE)**

Versele et ses collègues ont identifié 53 acides aminés conservés parmi de nombreuses septines dans la partie C-terminale du domaine liant le GTP qu'ils ont identifié comme l'élément unique de septines (Versele et al., 2004). Pan et ses collègues ont ensuite identifié 4 nouveaux motifs de septines appelés sep1-4 dont 3 situés entre les motifs G3, G4 et un dans l'élément unique de septines (Figure 5). L'élément unique de septines existe chez les septines opisthocontes et non-opisthocontes et son implication dans la formation des filaments des septines suggère que la fonction de formation des filaments est conservée à travers l'évolution (Nishihama et al., 2011).

➤ **Le domaine superhélice (coil coiled) :**

Le domaine en superhélice est un motif structural commun qui forme une super hélice via des séquences répétées de sept acides aminés nommés en anglais (*heptad repeats*) ce qui assure la médiation des interactions protéine-protéine (Mason and Arndt, 2004).

Bien que la plupart des septines des opisthocontes contiennent un domaine superhélice très près de leur extrémité C-terminale (Pan et al., 2007), cette fonctionnalité est absente dans toutes les septines chez les non-opisthocontes (Nishihama et al., 2011).

Le nombre des domaines super hélices varie de zéro, à trois. Il a été suggéré que ceux-ci peuvent être nécessaires soit pour les interactions avec d'autres septines soit pour les

interractions avec d'autres substrats(Casamayor and Snyder, 2003), (Versele and Thorner, 2005).

### **7.1.3. Complexes de septines**

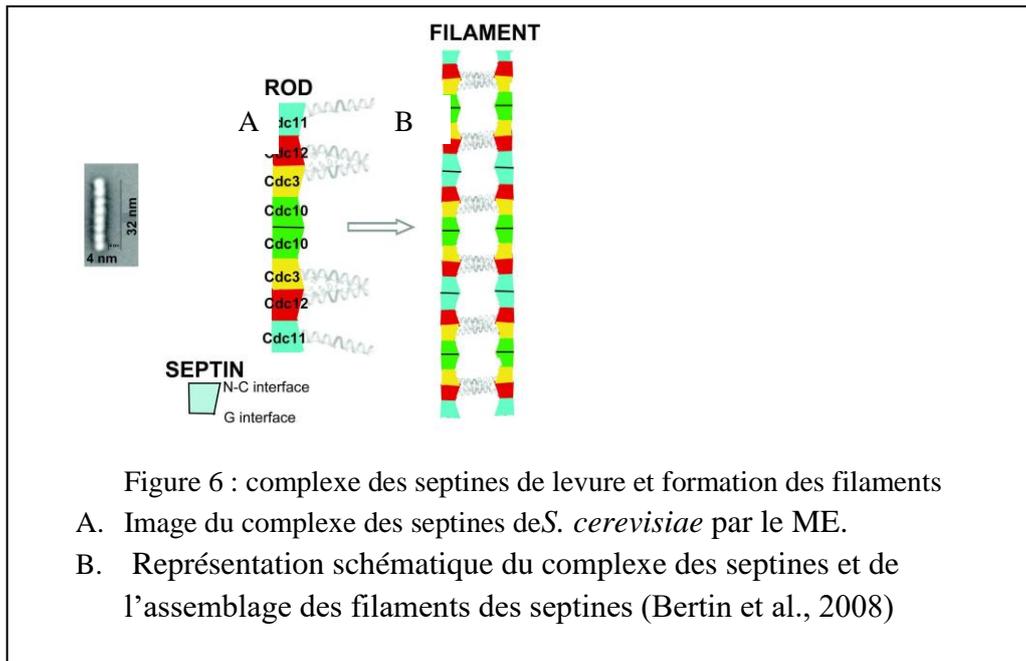
Depuis leur découverte, il a été suggéré que les septines fonctionnaient sous forme de complexes. La première caractérisation des complexes de septines a été faite chez la drosophile. Il a été montré que ces septines existaient dans un complexe hexamérique composé de deux exemplaires de Pnut, septine1 et septine 2 (Field et al., 1996) , (Oegema et al., 1998).

De même, le complexe des septines chez le levure semble d'être un octamère contenant des rapports stœchiométriques de CDC3, CDC10 et CDC12, avec des niveaux sous-stœchiométriques de Cdc11 et Shs1 (Frazier et al., 1998) . Il a été proposé que ces septines étaient en concurrence pour les positions terminales d'octamère(Bertin et al., 2008)(Garcia et al., 2011).

Plusieurs études ont prouvé que les septines fonctionnaient au sein de complexes. Il n'existe aucune preuve montrant qu'une septine pouvait fonctionner individuellement sans être incorporée dans un complexe (Fung et al., 2014).

#### **➤ Les complexes de septines chez les levures :**

Le complexe des septines le mieux caractérisé est celui de *S. cerevisiae*, qui a été identifié par microscopie électronique (ME) par Frazier et ses collègues. Ils ont montré que le complexe des septines existait en tant que structure en forme de tige constituée des septines CDC3, CDC10, CDC11, et CDC12 (Frazier et al., 1998). Plus tard, il a été déterminé que cette tige se composait de deux tétramères positionnés en symétrie dans l'ordre suivant : CDC11-CDC12-CDC3-CDC10-CDC10-CDC3-CDC12-CDC11 (Bertin et al., 2008). (Figure 6). Cette étude représente une avancée majeure dans la compréhension du complexe des septines en démontrant pour la première fois que l'assemblage des septines était très ordonné (Fung et al., 2014).



### ➤ Les complexes des septines chez les mammifères

Chaque type cellulaire dans un tissu pourrait avoir des complexes spécifiques des septines. En fait, les septines isolées à partir d'un tissu, contenant plusieurs types cellulaires, existent en quantité moyenne d'un mélange de complexes. Cependant, des complexes spécifiques présents dans un type cellulaire isolé entraînent une stœchiométrie entre les septines. Par exemple, plusieurs études ont révélé qu'au moins 10 septines différentes peuvent être détectées dans un tissu cérébral alors que des cultures pures de neurones hippocampiques primaires expriment seulement cinq septines qui coimmunoprécipitent (Tsang et al., 2011).

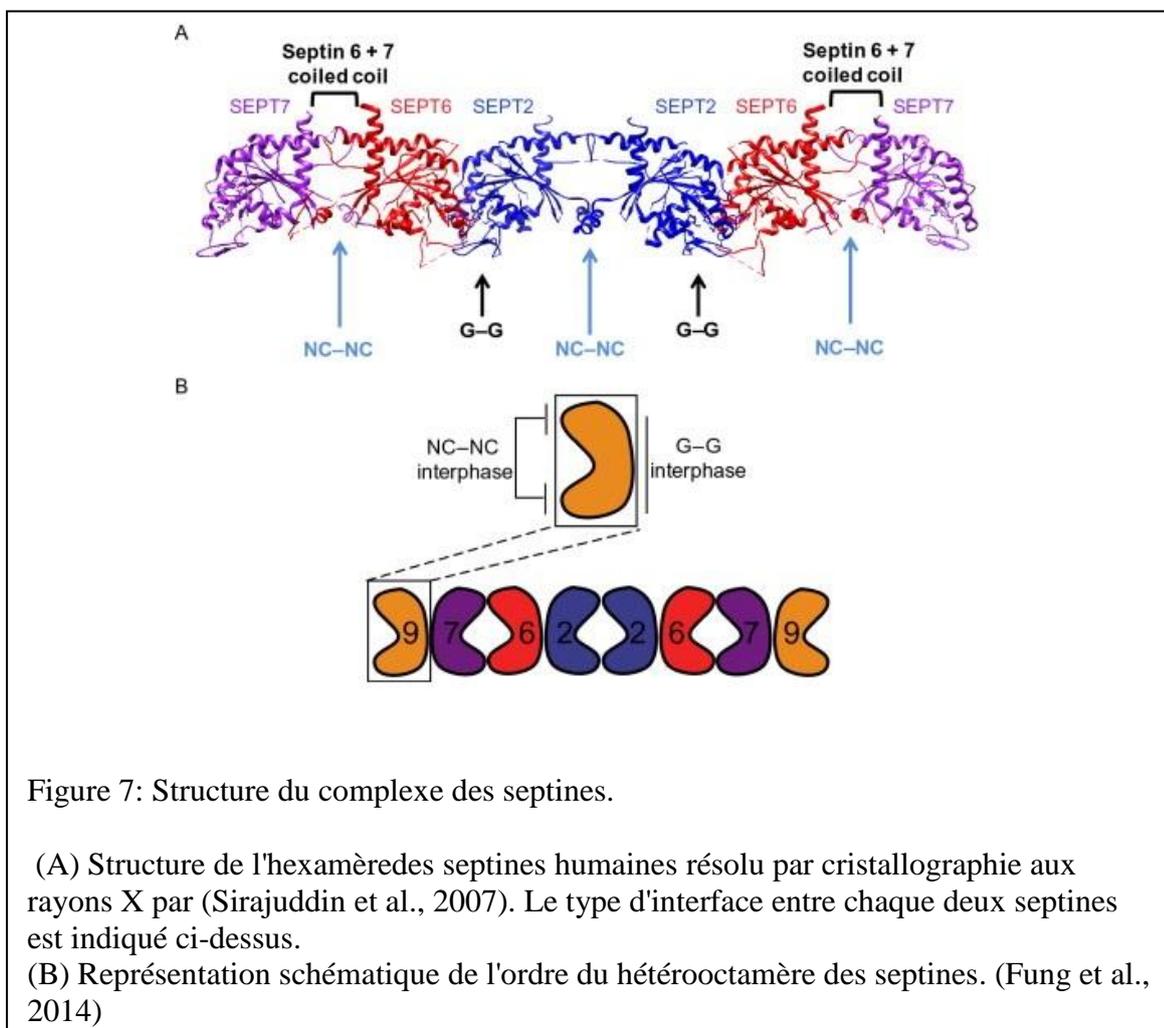
Il est tentant de spéculer que les complexes des septines sont constitués d'une combinaison des membres de chaque sous groupe. Cependant, on ne sait pas si un membre de chaque sous groupe est nécessaire pour la formation de ces complexes ou s'il existe toujours une stœchiométrie entre les septines qui composent le complexe (Fung et al., 2014).

### ❖ Les complexes hexamériques des septines

L'étude structurale du complexe des septines réalisée par Sirajuddin et ces collègues en 2007 a profondément éclairci notre compréhension de l'interaction entre les différentes septines. Dans cette étude, la structure moléculaire du complexe des septines a été résolue grâce à la cristallographie X-ray d'un complexe des septines recombinantes humaines (septine 2, septine 6, septine 7) exprimées dans *E. coli* (Sirajuddin et al., 2007).

Comme pour les complexes de septines de levure, la structure des complexes des septines humaines a révélé également une structure en forme de tige apolaire d'ordre suivant : septine 7- septine 6- septine 2- septine 2- septine 6- septine 7 (7-6-2-2-6-7).

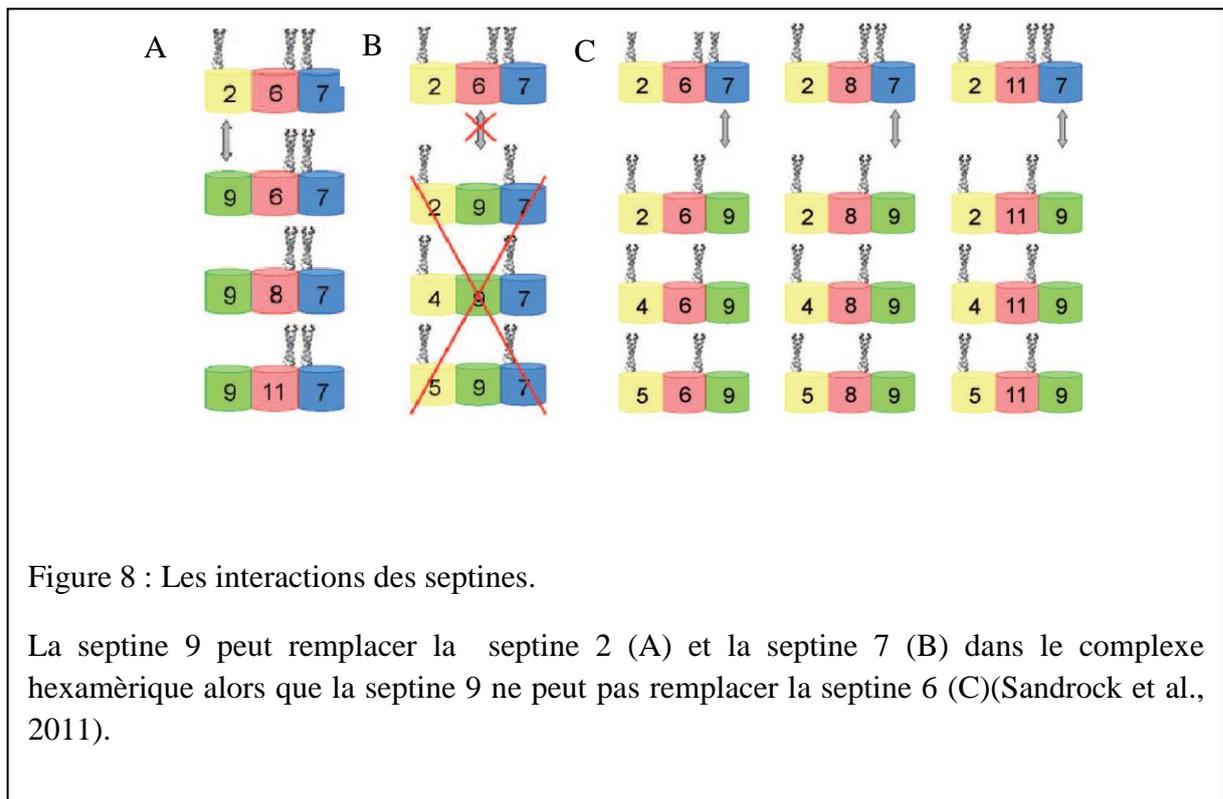
La structure cristalline a aussi identifié les points de contact entre les septines dans le complexe. Deux types d'interactions ont été identifiés entre les molécules des septines: soit les deux molécules interagissent entre elles en face-à-face par leur domaine de liaison au GTP (dénommé l'interface G), soit elles interagissent dos à dos par leur surface dans les N et C terminaux (appelée l'interface NC). Ainsi, les septines, septine 2/septine 6 et septine 7/septine 7 interagissent par leur interface G et les septines, septine 2/septine 2 et septine 6/septine 7 sont associées par leur interface NC (Sirajuddin et al., 2007) pour composer finalement l'hexamère (7-6-2-2-6-7) comme illustré dans le figure 7.



De plus, les domaines super hélices (coiled coil) situées dans la partie C-terminale des septines 6 et 7 interagissent directement les uns avec les autres et sont donc impliqués dans les interactions septines-septines (Low and Macara, 2006).

Par ailleurs, les différentes interactions des septines humaines ont été caractérisées par l'approche de double et triple hybride (Sandrock et al., 2011). Cette étude a confirmé que les membres du sous groupe de septines 2 et du sous groupe de septine 7 interagissent avec les membres du sous groupe septine 6, sans interaction directe entre septine 2 et septine 7.

La septine 9 qui ne fait pas partie du trimère (2/6/7), est néanmoins capable de se substituer à la septine 2, mais pas à la septine 6. De plus, l'hypothèse selon laquelle la septine 7 serait unique et non substituable (Kinoshita, 2003) est contredite par les résultats de l'approche triple hybride, montrant que cette septine 7 est partiellement échangeable avec la septine 9, en particulier si la septine centrale du trimère est la septine 11 (Figure 8. C).

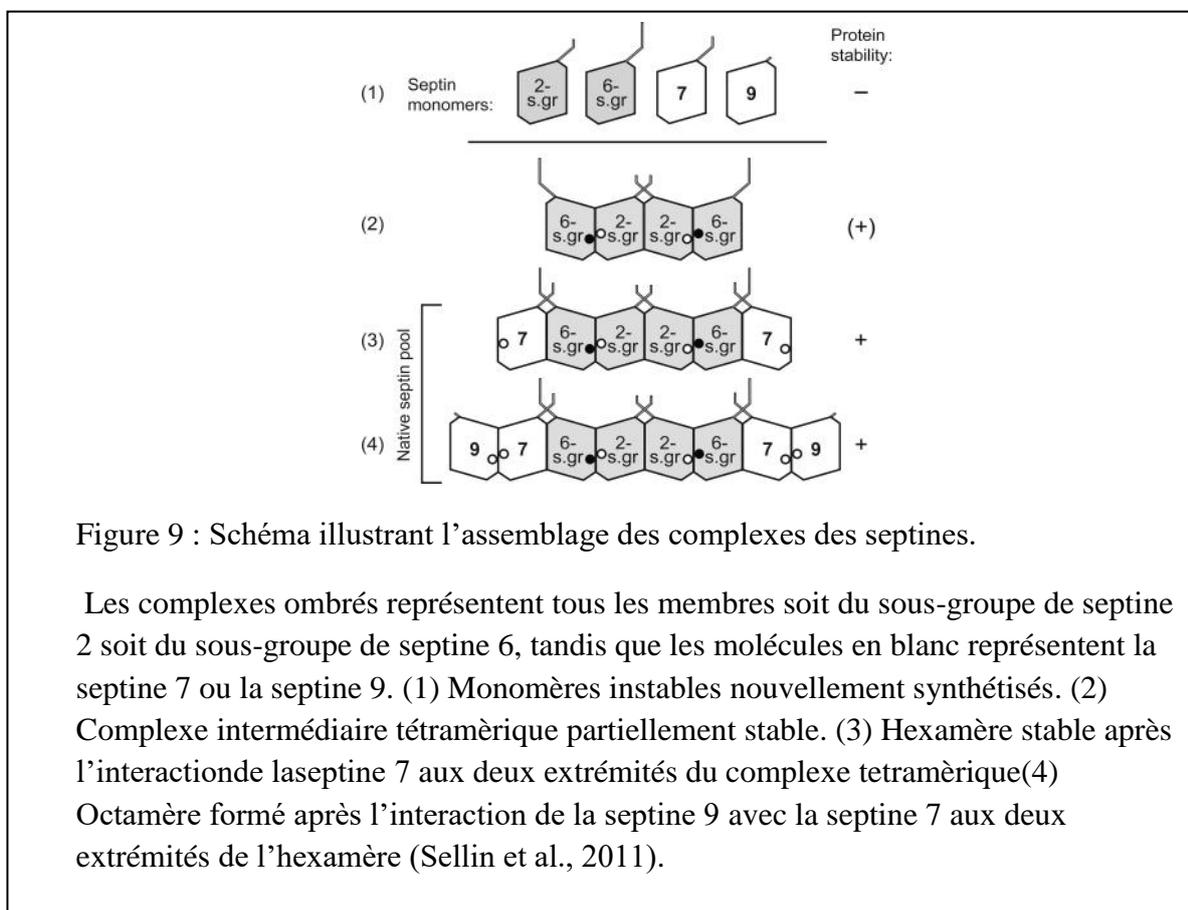


#### ❖ Les complexes octamériques des septines:

Deux études biochimiques des complexes des septines purifiées à partir des cellules HeLa ont montré que les septines existent en complexes hexamériques et octamériques à

l'ordre suivent septine 9- septine 7- septine 6- septine 2- septine 2- septine 6- septine 7- septine 9 (9-7-6-2-2-6-7-9).

Dans la première étude Sellin et ces collègues ont suggéré que les septines humaines existent en tant que des hétéromères stables uniquement si ces complexes sont composés de six à huit molécules (Figure 9). En utilisant les méthodes de fractionnement ces auteurs ont montré que la masse moléculaire des complexes septines correspondait à celle d'un octamère. La déplétion en septine 9 aboutit à des oligomères de masse inférieure comparable à celle de l'hexamère 7-6-2-2-6-7, cela suggère que la septine 9 participe à la formation de l'octamère. Ainsi, tous les complexes contiennent la septine 2, la septine 6 et la septine 7, tandis que seul l'octamère contient la septine 9 (Sellin et al., 2011).



Dans la deuxième étude Kim et ses collègues ont utilisé la technique de *pull down* et la purification par affinité pour isoler des complexes des septines qui contiennent des septines normales et une septine mutée dans son interface G ou NC.

En utilisant cette technique ils ont montré que la septine 9 occupe une position terminale dans le complexe octamérique des septines et que la septine 9 mutée dans son interface NC, qui ne peut pas s'auto-associer, perturbe la formation des filaments des septines.

Par ailleurs, deux types d'assemblage sont proposés pour la formation d'octamère : La septine 9 peut soit s'intercaler entre deux septines 7 pour former un complexe linéaire, semblable à l'octamère chez la levure (Bertin et al., 2008), soit interagir à la fois avec septine 6 et septine 7 en s'associant latéralement à un trimère (Versele and Thorner, 2005), (Sandrock et al., 2011) (Figure 10).

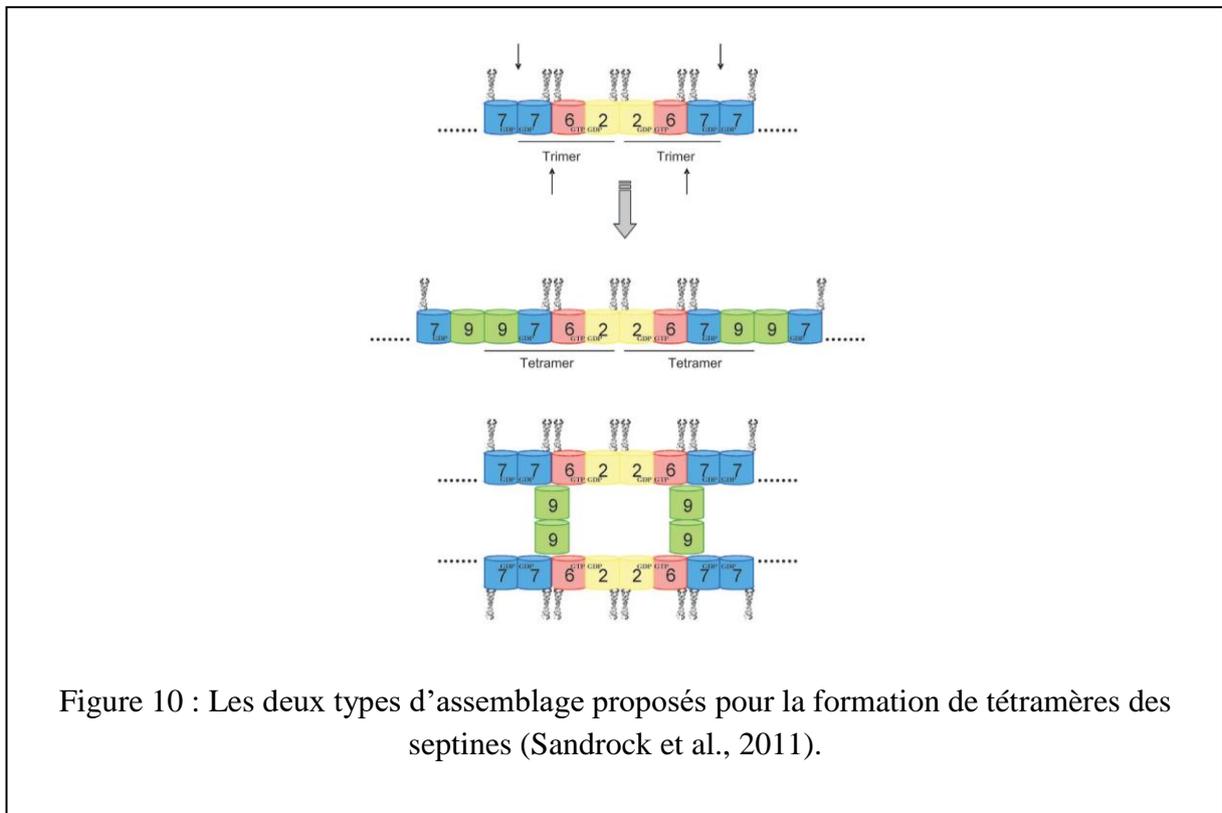
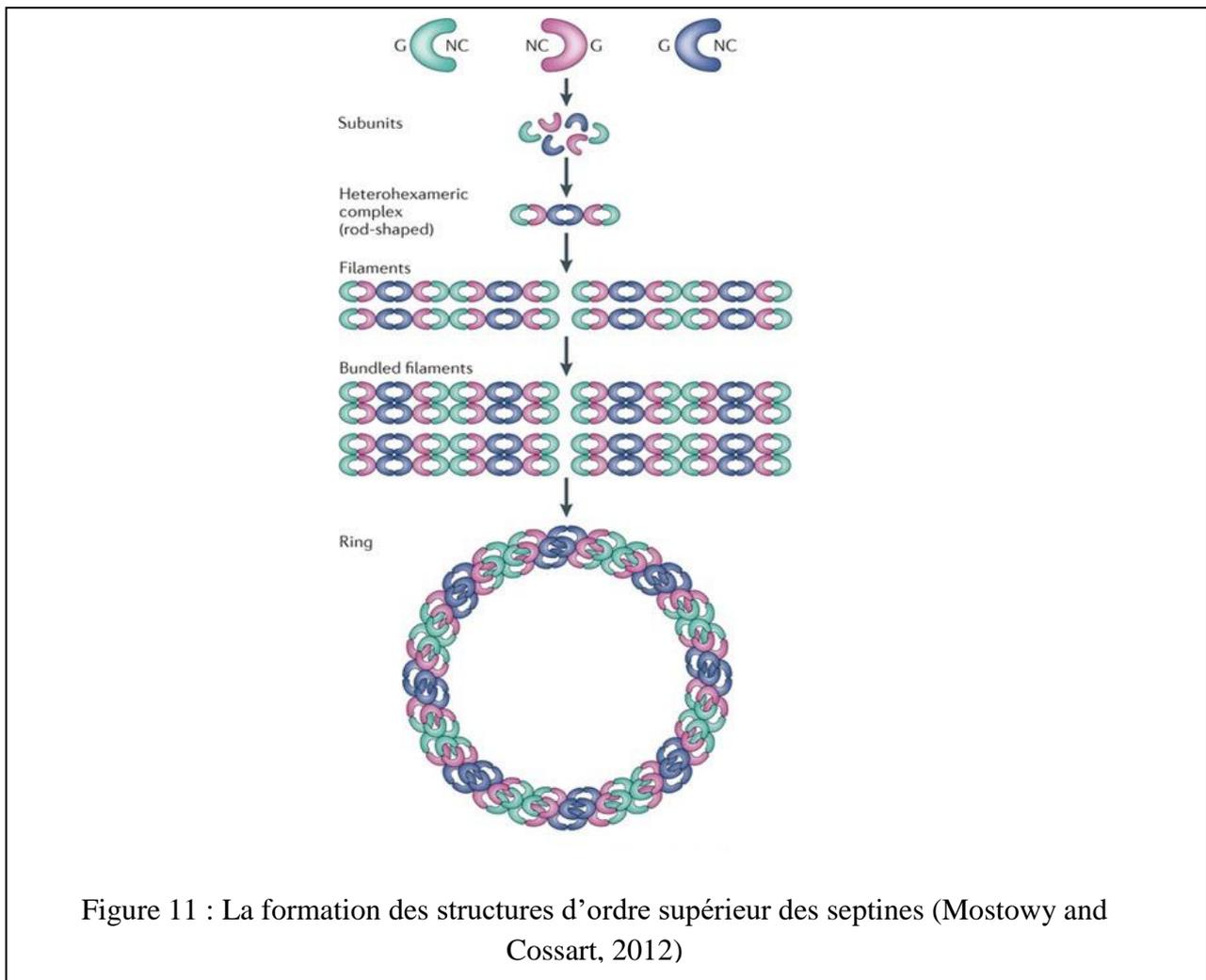


Figure 10 : Les deux types d'assemblage proposés pour la formation de tétramères des septines (Sandrock et al., 2011).

#### 7.1.4. Les structures d'ordre supérieur des septines

Les complexes de septines hexamériques et octamériques décrits ci-dessus sont considérés comme des blocs pour construire des structures d'ordre supérieur. Le protofilament est formé par l'association de chaque oligomère bout à bout, alors que les structures d'ordre supérieur comme les filaments et les anneaux peuvent également être formés par l'interaction latérale entre les protofilaments (Sirajuddin et al., 2007)(Bertin et al., 2008)(John et al., 2007)(Garcia et al., 2011)(DeMay et al., 2011)(Mostowy and Cossart, 2012). (Figure 11)



### 7.1.5. Régulation de l'assemblage des Septines

#### ➤ Régulation par le GTP/GDP

La liaison et l'hydrolyse du GTP permettent aux protéines GTPases d'agir comme des interrupteurs moléculaires. La plupart des septines chez les levures et les mammifères sont capables de lier et d'hydrolyser le GTP. Des nucléotides liés aux septines ont été co-cristallisés avec le complexe des septines 2/6/7 : la septine 2 et la septine 7 étant liées au GDP, et la septine 6 au GTP (Sirajuddin et al., 2007).

Les taux d'échange et d'hydrolyse des nucléotides par les septines sont lents à la fois *in vitro*, et *in vivo* (Frazier et al., 1998) (Huang et al., 2006). *In vitro*, les polymères de septines de mammifères ont peu ou pas d'activité GTPase (Kinoshita et al., 2002) (Sheffield et al., 2003).

Pour de nombreuses septines, une mutation au niveau de résidus contribuant à la liaison du GTP peut altérer la formation, l'appariement, la localisation et/ou la fonction des filaments de septines (Kinoshita et al., 1997)(Casamayor and Snyder, 2003)(Hanai et al., 2004). En effet, dans le cas du dimère de septine 2, une mutation au niveau de la thréonine-78 empêche la liaison et l'hydrolyse du GTP et l'appariement.

Etant donné que l'hydrolyse du GTP des complexes oligomériques est lente, d'autres facteurs cellulaires doivent être impliqués dans la régulation de la réaction. L'activité GTPase des septines ne semble donc pas jouer un rôle régulateur dans l'assemblage des hétéro-oligomères au-delà du repliement initial et de la dimérisation des monomères.

### ➤ **Régulation par Cdc42 et Rho**

La Cdc42, est une petite Rho-GTPase qui joue un rôle fondamental dans l'assemblage des septines chez la levure *S.cerevisiae*(Gladfelter et al., 2002). Des mutations au niveau de Cdc42 entraînent des défauts de la localisation polarisée de l'actine et des septines au niveau des sites de bourgeonnement (Gladfelter et al., 2001).

Dans les cellules de mammifères, une étude a démontré une liaison directe de complexes de septines (septines 2/6/7) à des effecteurs en aval de Cdc42, appelés Borg 1 à 3. La surexpression de Borg3 induit l'assemblage des septines en filaments épais, cet effet est négativement régulé par l'expression d'un mutant constitutivement actif de Cdc42, qui inhibe l'interaction Borg3-septine et aboutit à la perte des filaments (Joberty et al., 2001).

La protéine Rho qui est aussi une petite GTPase joue un rôle de régulateur dans divers processus cellulaires tels que le remodelage du cytosquelette d'actine, la cytokinèse et la motilité cellulaire. Il a été suggéré que les voies de transduction de signal Rho-dépendante contrôlent non seulement le cytosquelette d'actine, mais aussi la morphologie des filaments de septines (Nagata and Inagaki, 2005). Une autre étude a identifié la Rhotekine, une protéine effectrice en aval de Rho, comme une candidate régulatrice organisant les structures de septines. Il a été montré que la Rhotekine interagit avec la septine 9 par le région contenant le domaine se liant le GTP et cette association est suffisante pour la perturbation des filaments de septine similairement à l'effet de l'activation de Rho (Ito et al., 2005). Plus tard, il a été montré que les altérations de la séquence de la septine 9 causant l'amyotrophie héréditaire névralgique sont associées à une résistance à la signalisation de Rho / Rhotekin (Sudo et al., 2007).

## ➤ **Régulation par l'anilline et la myosine II**

Dans des cellules de mammifères en culture, l'assemblage des septines semble se faire en association avec des structures d'actine telles que des anneaux contractiles et des fibres de stress (Joberty et al., 2001)(Kinoshita et al., 2002). Mais cette interaction n'est pas directe, car leur association nécessite des molécules adaptatrices telles que l'anilline, une protéine de liaison à l'actine (Oegema et al., 2000).

L'anilline est considérée comme la principale protéine adaptatrice de septines au niveau de l'anneau contractile. Cette protéine est localisée dans le noyau lors de l'interphase, et au niveau des fuseaux mitotiques lors de la cytokinèse. La surexpression d'un fragment d'anilline incapable de se lier à l'actine et interagissant avec les septines, est capable à la fois de perturber l'organisation des septines et aussi de causer la perte des faisceaux d'actine dans la cellule (Kinoshita et al., 2002).

Chez la plupart des mammifères, la division cellulaire s'achève par la formation d'un sillon de clivage, sans lequel la séparation se fait par l'action contractile de la myosine II (myosine non musculaire) et des filaments d'actine. La septine 2 est impliquée dans l'organisation des filaments d'actine contractile par son interaction directe à la myosine II, qui agirait alors comme une protéine adaptatrice reliant les septines à l'actine (Joo et al., 2007).

## ➤ **Régulation des septines par des modifications post-traductionnelles**

### ❖ **SUMOylation**

La première modification post-traductionnelle caractérisée dans les septines était la SUMOylation qui aboutit à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) sur une lysine acceptrice d'une protéine cible, (Johnson and Blobel, 1999). Les septines de *S. cerevisiae* Cdc3, Cdc11, et Shs1 sont SUMOylées lors de la transition G2 / M et au moment de la cytokinèse. Les mutations de tous les sites de SUMOylation sur Cdc3, Cdc11 et Shs1 inhibent la disparition de l'anneau des septines sur les sites de la division précédente, ce qui suggère que la SUMOylation régule l'élimination des vieux anneaux des septines (Takahashi et al., 1999)(Takahashi et al., 2003). Certaines septines de mammifères possèdent des sites possibles de SUMOylation, mais il reste à vérifier si la SUMOylation est capable de réguler le désassemblage des complexes.

### ❖ **Acétylation :**

Il a été montré que les septines de *S. cerevisiae* CDC3, CDC10, CDC12 et Shs1 sont acétylées. Chez les mutants d'acétylation, des anomalies ont été observées dans la localisation

des anneaux de septines à la base du bourgeon (Mitchell et al., 2011). Vingt sites d'acétylation ont été cartographiés sur les septines de levure dont deux sont en N-ter et six en C-ter. Les 13 sites restants se situent dans le domaine se liant le GTP avec plusieurs exemples d'acétylation sur des paires de résidus d'acides aminés identiques. Des résidus acétylés sont situés dans les régions impliquées dans la formation de l'interface G entre les monomères des septines. Ainsi, il semble probable que ces modifications d'acétylation influencent l'assemblage et / ou la stabilité des hétéropolymères de septines (Hernández-Rodríguez and Momany, 2012).

### ❖ **Phosphorylation**

La phosphorylation est la modification post traductionnelle la plus caractérisée chez les septines. Chez la levure, cinquante neuf sites de phosphorylations ont été cartographiés. Les kinases Cdc28, Cla4 et GIN4 ciblent les septines et affectent l'assemblage et la dégradation de l'anneau des septines. La phosphorylation des septines de levure est généralement retrouvée dans les régions N- et C-terminales. La perte de la phosphorylation des septines conduit à des défauts dans la morphogenèse et la cytokinèse. L'état de phosphorylation semble donc réguler la dynamique de formation de l'anneau des septines (Hernández-Rodríguez and Momany, 2012).

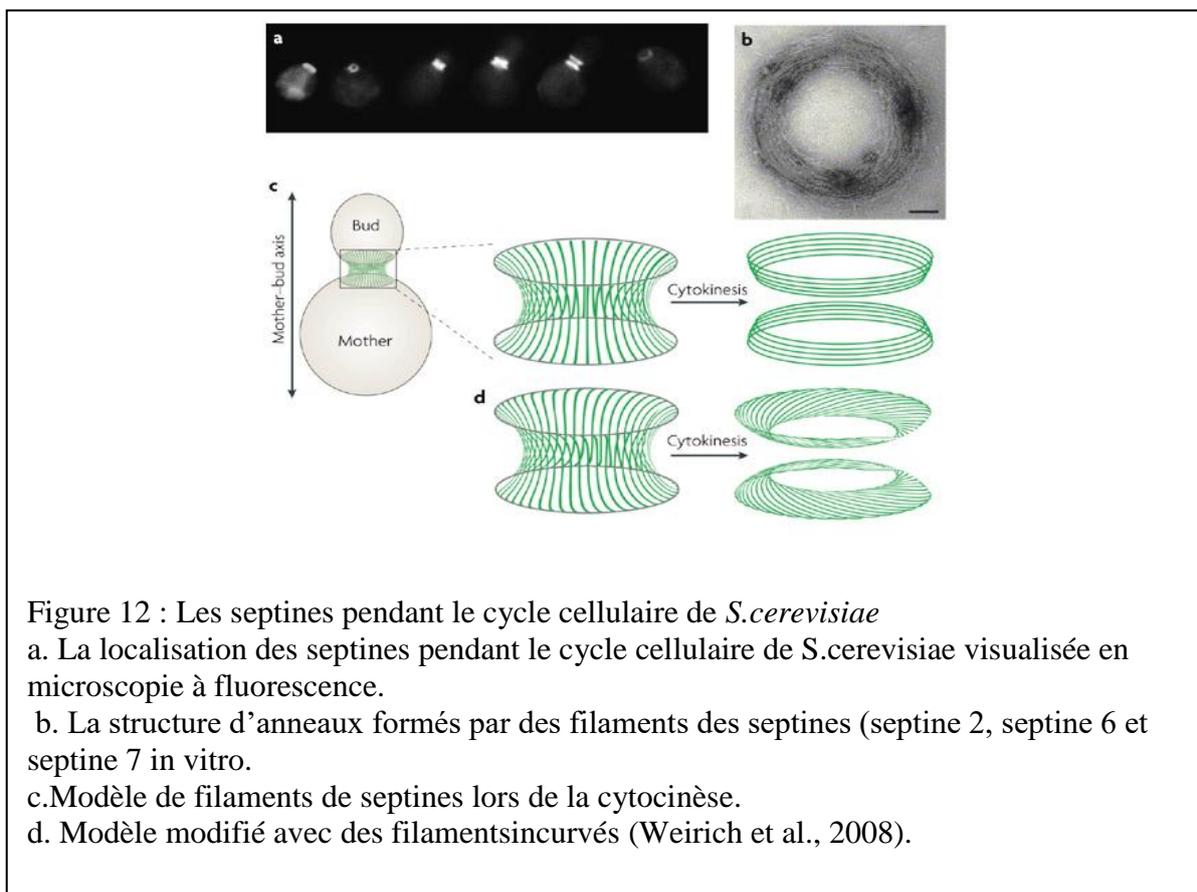
Garcia et al. ont montré que lors de la substitution de la septine Cdc11 par la septine Shs1 dans l'hétérooctamère des septines, les octamères s'associent latéralement pour former des filaments courbes qui s'assemblent en anneaux. Pour déterminer le rôle de la phosphorylation de Shs1 dans la formation des structures d'ordre supérieur des septines, Garcia et al. ont généré une série de protéines mutantes où l'acide aspartique (D) remplace la serine (S) ou la thréonine (T) et imite l'état phosphorylé. La mutation phospho-mimétique du T6 dans l'extrémité N-terminale n'a aucun effet sur la formation d'anneaux de septines. La mutation de S259 dans la région entre le G4 et la SUE conduit à inhiber la formation d'anneaux ou à la formation d'un réseau avec un motif répétitif régulier. Cela a conduit à suggérer que le S259 pourrait agir comme un interrupteur moléculaire permettant des changements dans l'organisation des structures ordre supérieur des septines (Garcia et al., 2011). Plusieurs études ont montré que les septines de mammifères peuvent être phosphorylées par des kinases telles que la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase I cGMP-dépendante, la kinase Aurora-B et la kinase DYRK1A dans les cellules mitotiques (Xue et al., 2000)(Xue et al., 2004)(Qi et al., 2005)(Sitz et al., 2008). Des études complémentaires devraient permettre de mettre en évidence si la phosphorylation et la

déphosphorylation jouent un rôle important dans la régulation spatiale et temporelle de l'assemblage et des fonctions biologiques des septines.

### 7.1.6. Les rôles moléculaires des septines

#### ➤ Septines comme des protéines d'échafaudage:

Les structures d'ordre supérieur des septines peuvent servir comme des échafaudages pour accumuler des protéines et favoriser leur interaction. L'exemple le mieux caractérisé est celui de la levure dans lequel, avant la cytokinèse, les septines se localisent autour d'un rétrécissement à la base du bourgeon et se divisent en deux anneaux. (Gladfelter et al., 2001)(DeMay et al., 2011) figure 12.



Il a été suggéré que les filaments des septines ne contribuent pas à la génération de forces contractiles (Kinoshita, 2006) mais participent à la cytokinèse en permettant à plusieurs protéines qui ont des rôles importants dans la cytokinèse de s'accumuler à l'emplacement de division (McMurray and Thorner, 2009). Les septines forment une structure au site de division des cellules de mammifères similaire de celle observée chez la levure et sont nécessaires pour la localisation de nombreuses protéines (Kinoshita and Noda, 2001).

Dans des cellules de mammifères d'autres échafaudages de septines fonctionnent pour maintenir la localisation subcellulaire et promouvoir des interactions protéine-protéine fonctionnelles. En effet, les septines corticales peuvent agir comme des échafaudages pour retenir les protéines membranaires avec lesquelles elles interagissent comme les protéines GLSTs qui sont des protéines transmembranaires transporteurs de glutamate et aspartate. Une liaison directe entre les protéines GLSTs et les septines a été démontrée (Kinoshita et al., 2004). La déplétion de la septine 7 augmente l'activité des protéines GLST alors que l'administration d'un médicament stabilisateur des filaments des septines, le forchlorfenuron43, la diminue (Hu et al., 2008)(Hagiwara et al., 2011).

#### ➤ **Les barrières de diffusion des septines**

La barrière de diffusion est une barrière composée de complexes multiprotéiques qui limitent un compartiment cellulaire pour contrôler le mouvement des protéines de ce compartiment. Cette compartimentation est cruciale lors du bourgeonnement chez la levure, où la croissance cellulaire doit être restreinte au bourgeon. Lorsque les cellules de levure commencent leur reproduction asexuée, la croissance est concentrée dans une zone sélectionnée, qui devient le site de bourgeonnement. Après l'établissement du bourgeon, la cellule entre dans la croissance isotrope, au cours de laquelle on observe une croissance sur l'ensemble de bourgeon. Cette croissance polarisée est rendue possible par un anneau de septines situé à la séparation du bourgeon et de la mère (Barral et al., 2000). Cet anneau de septines peut efficacement fonctionner comme une barrière de diffusion moléculaire (Rodal et al., 2005).

Chez les mammifères, des barrières de diffusion des septines ont été proposées dans plusieurs compartiments subcellulaires :

- Une barrière de diffusion constituée de septines existe au niveau du pont cytoplasmique (en anglais *midbody*) entre deux cellules divisées (Schmidt and Nichols, 2004).
- Les septines sont impliquées dans la formation d'une barrière de diffusion à la base du cil primaire des cellules de mammifères (Hu et al., 2010).

#### ➤ **Régulation de la dynamique des microtubules**

Les septines s'associent avec les microtubules dans plusieurs lignées cellulaires comme les cellules HMEC (*Human mammary epithelial cells*), HeLa (Henrietta Lacks) ou MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*)(Nagata et al., 2003)(Hanai et al., 2004)(Spiliotis et al.,

2008). Il a été rapporté que la septine 9 s'associait directement avec les microtubules par son domaine central contenant le domaine de liaison au GTP (Nagata et al., 2003), et que sa co-localisation avec les microtubules était sensible à la dépolymérisation des microtubules induite par le nocodazole (Surka et al., 2002). De plus, il a été montré que la région N-terminale de la septine 9 contient des motifs répétés (K / RxxE / D et R / KRxE), qui assurent l'interaction directe entre la septine 9 avec les microtubules (Bai et al., 2013).

La déplétion ou la surexpression des septines affecte la dynamique de microtubules en altérant les modifications post-traductionnelles des microtubules. En effet, les modifications post-traductionnelles des microtubules sont étroitement associées à leur stabilité. Dans les cellules HeLa, la déplétion de la septine 7 provoque une augmentation de la résistance des microtubules à la dépolymérisation par le traitement au nocodazole, ainsi qu'une augmentation du niveau d'acétylation de la tubuline (Kremer et al., 2005). De plus, la déplétion de la septine 9 (variant 3) diminue le niveau de tubuline polymérisée sans altérer les niveaux d'expression des tubulines (Nagata et al., 2003). En revanche, la surexpression de la septine 9 (variant 4) confère la stabilisation des microtubules par le traitement avec le paclitaxel. De plus, les cellules surexprimant le variant 4 de la septine 9 repolymérisent les microtubules plus lentement après le traitement par le froid (Chacko et al., 2012). De même, les tumeurs exprimant des niveaux élevés de variant 1 de la septine 9 sont résistantes au paclitaxel (Amir and Mabjeesh, 2007)(Froidevaux-Klipfel et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré que les filaments des septines fournissent un échafaudage pour les enzymes de la polyglutamylation des microtubules ce qui augmente cette modification et aboutit à la stabilisation des microtubules (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). L'ensemble de ces études suggère que les septines affectent la dynamique des microtubules. Par ailleurs, la modulation de la dynamique des microtubules par les septines a été reliée à l'interaction des complexes septines (2, 6,7) avec la protéine stabilisatrice des microtubules MAP4 (*microtubule-associated protein 4*). En effet, MAP4 interagit avec l'hexamère des septines (2.7.6) par un petit domaine riche en proline qui peut lier aussi les microtubules. En conséquence, l'association de MAP4 avec des filaments de septines séquestre MAP4 loin de microtubules, ce qui conduit à une dépolymérisation de microtubules (Kremer et al., 2005). Un modèle alternatif été aussi proposé dans lequel MAP4 entre en compétition avec la septine 2 pour la liaison avec les microtubules. Ceci impliquerait que les complexes des septines occupent les sites de liaison de MAP4 et interfèrent directement avec la liaison MAP4-tubuline (Spiliotis et

al., 2008). Donc, en se liant à MAP4, les complexes de septines pourraient réguler la dynamique des microtubules, en empêchant leur stabilisation.

### ➤ **Organisation des membranes et la rigidité corticale**

Plusieurs études suggèrent que les septines influencent la forme des cellules animales et la rigidité corticale pendant l'interphase et pendant la division cellulaire. Dans les deux cas, l'effet de septines sur les propriétés de la membrane plasmique pourrait intervenir dans l'organisation du cortex actomyosine, ou être due à un effet direct des filaments de septines sur la rigidité ou la composition de la membrane (Bridges and Gladfelter, 2015).

Dans une étude réalisée par Gilden et ses collègues (Gilden et al., 2012) les lymphocytes T ont été soumis à un milieu hypotonique, ce qui conduit à un gonflement rapide des cellules à cause de la pression hydrostatique interne élevée. Ensuite, la pression osmotique du milieu a été augmentée lentement par une diminution contrôlée de son volume. Dans ces conditions, les cellules sous-exprimant la septine 7 retrouvent leur volume normal plus lentement que les cellules contrôles ce qui suggère que les septines sont nécessaires pour la rétraction du cortex cellulaire. Une observation similaire a été obtenue lors de traitement avec le Latrunculin B qui cause la dépolymérisation d'actine mais il n'y avait pas d'effet additif lors de la déplétion de la septine 7 avec la dépolymérisation l'actine. Comme conclusion, les septines et le cytosquelette d'actomyosine peuvent coopérer pour assurer la rétraction corticale de la cellule (Gilden et al., 2012).

## **7.1.7. Les processus cellulaires impliquant les septines**

### ➤ **La division cellulaire**

#### ➤ **Division cellulaire chez les levures**

Les levures bourgeonnantes subissent des divisions asymétriques, résultant en deux cellules avec des tailles distinctes. En entrant dans un nouveau cycle cellulaire, cinq septines (CDC3, CDC10, Cdc11, CDC12 et Shs1) sont recrutées sur le site du bourgeon d'une manière dépendante de Cdc42 (Iwase et al., 2006). Les septines sont d'abord organisées en patch, puis s'organisent dans un anneau cortical dynamique (Longtine and Bi, 2003). Les septines se localisent à la base du bourgeon lors de la division et sont impliquées dans plusieurs événements qui assurent la séparation entre les cellules mères et filles:

- **La spécification de lieu de bourgeonnement**

La formation d'anneau de septines commence au centre de la zone de bourgeonnement grâce à l'inhibition localisée de Cdc42 puis les septines migrent à la périphérie de la zone où elles se rassemblent en un anneau ( Okada et al., 2013).

- **La croissance polarisée des bourgeons**

Dans cette étape l'anneau de septines se transforme en une structure de sablier au niveau du col du bourgeon et fonctionne comme une barrière de diffusion qui restreint le mouvement du transport polarisé. De ce fait, l'anneau de septines aide à maintenir la polarité lors de la croissance des bourgeons (Barral et al., 2000).

- **La régulation de point de contrôle du cycle cellulaire**

La progression du cycle cellulaire exige que la protéine Swe1p (*S.cerevisiaeWee1-related kinases*) soit phosphorylée et dégradée en phase G2 / M. Swe1p est localisée dans le noyau et sur le côté bourgeon de la tubulure de bourgeonnement. Sa localisation/dégradation nécessite Hsl1p (*Histone synthetic lethal*) et son partenaire Hsl7p, protéines localisées au niveau du côté bourgeon du col de bourgeon d'une manière dépendante des septines. Si la morphogénèse de bourgeon se déroule normalement, Swe1p est phosphorylée et dégradée tandis que dans le cas de la morphogénèse anormale dans les cellules exprimant des septines mutées, les Hsl1p et Hsl7p seront libérées à partir du col des bourgeons, ce qui conduit à la stabilisation de Swe1p et l'arrêt du cycle cellulaire en G2 (Barral et al., 1999).

- **Division cellulaire chez les mammifères**

La division des cellules de mammifères commence par la formation d'un anneau contractile riche en actine et en myosine au niveau du cortex de la cellule entre les chromosomes ségrégués. Cet anneau se resserre, au milieu de la cellule pour créer un sillon de clivage (*cleavage furrow*). L'anneau continue de se contracter jusqu'à la formation d'un pont mince (appelé le pont intercellulaire) composé de la tubuline acétylée à la fin de la télophase. Le pont cytoplasmique (*midbody*) est une structure dense des protéines situé au milieu du pont intercellulaire où les protéines impliquées dans la rupture du pont intercellulaire (un processus connu sous le nom abscission) sont recrutées.

- **La ségrégation des chromosomes**

Il a été montré que la septine 1 (Qi et al., 2005), les septines 2, 6 et 9 étaient localisées aux fuseaux mitotiques (Spiliotis et al., 2005)(Nagata et al., 2003).

En plus, la septine 7 a été impliquée dans la localisation de CENP E (*Centromere protein E*) aux kinétochores (Zhu et al., 2008). L'inhibition de l'expression de la septine 2 amène à une ségrégation retardée des chromosomes ce qui ressemble à la perte de CENP E. Les septines pourraient former un échafaudage pour CENP E et autres effecteurs afin de coordonner la cytokinèse avec la ségrégation des centrosomes (Spiliotis et al., 2005).

#### ▪ **L'organisation de sillon de clivage**

L'analyse par immunofluorescence des septines pendant la division cellulaire a indiqué que lors de l'anaphase, les septines 2, 6, 7, 9 et 11 se trouvent le long du sillon de clivage (Estey et al., 2010), (Joo et al., 2007). Au moins deux septines (septine 2 et septine 11) sont impliquées dans l'organisation du sillon de clivage car leur déplétion conduit à une constriction anormale où l'ingression est survenue d'un côté des deux noyaux ségrégés (Estey et al., 2010). L'inhibition de l'expression de la septine 9 ne conduit pas à des défauts au sillon de clivage, mais plutôt entraîne des défauts dans l'abscission (Estey et al., 2010). Le rôle de la septine 9 dans l'abscission n'est pas encore bien compris mais la déplétion de septine 9 conduit à une mauvaise localisation de la sec8 au pont intercellulaire, ce qui suggère un rôle potentiel de la septine 9 dans l'attachement (*tethering*) des vésicules de l'exocytose au pont cytoplasmique.

#### ▪ **La cytokinèse**

Les septines sont impliquées dans la cytokinèse car l'inhibition de leur expression conduit à l'échec de la cytokinèse (Kremer et al., 2005) (Spiliotis et al., 2005). De plus, il a été montré que le niveau d'expression des différentes septines varie au cours de la cytokinèse, ce qui indique un rôle spécifique des septines dans ce processus (Estey et al., 2010).

#### ❖ **La régulation de la réponse aux dommages de l'ADN**

Il a été montré que le complexe des septines 2, 6 et 7 interagit avec SOCS7 (*Suppressor of Cytokine Signaling-7*) qui est une protéine de localisation nucléaire et joue le rôle de transporteur pour déplacer Nck (une protéine adaptatrice associée à l'actine) au noyau pour arrêter le cycle cellulaire en cas des dommages de l'ADN.

De manière surprenante, la déplétion des septines donne lieu à une localisation nucléaire de SOCS7 et Nck et amène à l'arrêt du cycle cellulaire (Kremer et al., 2007). Dans cette étude il a été proposé que les septines régulent la réponse aux dommages de l'ADN lors de la mitose en contrôlant la distribution cellulaire de SOCS7 et Nck.

## ➤ **La polarité cellulaire**

La polarité cellulaire est caractérisée par une asymétrie dans la formation de la membrane plasmique, dans la distribution des organelles intracellulaires et du cytosquelette. Cette distribution polarisée concerne aussi bien les protéines que les lipides. Cette asymétrie se crée selon un axe, par exemple l'axe apico-basal pour les cellules épithéliales polarisées. La polarité cellulaire n'assure pas seulement la morphologie et la fonction des épithéliums, mais elle est impliquée aussi dans des processus du développement comme la migration cellulaire et la division.

L'implication des septines dans la polarité cellulaire est étroitement liée à leur capacité à former des barrières de diffusion et des échafaudages moléculaires. La nature relativement stable des structures des septines leur permet de maintenir des positions stables, de définir des structures cellulaires distinctes et de recruter des effecteurs spécifiques. Ces différentes fonctions sont en accord avec un rôle crucial des septines dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire (Fung et al., 2014).

### ❖ **L'établissement de la polarité cellulaire dans les levures bourgeonnantes**

Comme il a été détaillé plus haut, les septines forment un échafaudage moléculaire sur le site de bourgeonnement qui contribue à la polarité apicale du bourgeon en recrutant des facteurs nécessaires et spécifiques au site de bourgeonnement. De plus, l'anneau de septines à la base du bourgeon restreint le mouvement des protéines à travers le col de bourgeon pendant sa croissance, ce qui joue un rôle clé dans le maintien de l'asymétrie corticale.

### ❖ **L'établissement de la polarité cellulaire chez les cellules de mammifères**

Les septines participent à l'établissement de la polarité cellulaire dans les cellules de mammifères. En effet, dans les lymphocytes T amiboïdes les septines participent à la rigidité de la membrane et à l'établissement de la polarité selon l'axe dit avant/arrière (*front-rear*) de la motilité en limitant les protrusions à l'avant et l'arrière de la cellule. Par cette activité les septines facilitent le mouvement directionnel de la cellule. L'inhibition de l'expression de septine 7 dans les lymphocytes T induit la formation de plusieurs protrusions élargies empêche un mouvement directionnel au cours de la migration (Tooley et al., 2009).

Dans les cellules MDCK, il a été montré que les protofilaments des microtubules sont guidés par les protofilaments des septines. Les vésicules de transport destinées à la membrane,

sont transportées sur ces microtubules. La déplétion de la septine 2 diminue le transport des vésicules du réseau trans golgien, (*trans Golgi network* (TGN)), à la membrane plasmique. En conséquence, les marqueurs des membranes apicale et basolatérale s'accumulent dans le cytoplasme et les cellules ne parviennent pas à adopter la morphologie caractéristique d'une cellule épithéliale polarisée (Spiliotis et al., 2008).

➤ **Le trafic vésiculaire :**

Les premières études concernant le rôle des septines dans le trafic vésiculaire ont montré que les complexes d'exocyst coimmunoprécipitaient avec un filament composé de quatre septines (septine 2, 4, 6 et 7). De plus une colocalisation partielle a été observée entre le complexe des septines et l'exocyst ce qui suggère une interaction et un rôle important de ces deux complexes dans l'organisation des protéines de la membrane plasmique des neurones (Hsu et al., 1998).

L'exocytose est un processus facilité par les protéines SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) qui assurent la fusion des membranes. Ce processus commence par l'association de la protéine VAMP (*vesicle-associated membrane protein*), qui est ancrée à la membrane de la vésicule, avec la SNAP-25 (*synaptosome-associated protein of 25 kDa*) et la syntaxine localisées sur la membrane cible, pour former un complexe ternaire. En conséquence, ce complexe des protéines SNAREs forment une liaison entre les deux membranes opposées (la membrane de la vésicule et la membrane cible) qui aboutira par des changements conformationnels des différentes protéines à un rapprochement et à la fusion des deux membranes (Figure 13). (Beites et al., 2005), (Chen and Scheller, 2001).

Le rôle des septines dans la régulation de l'exocytose est suggéré par le fait que les septines 2 et 5 interagissent en complexe avec la région C-terminale de la syntaxine qui est aussi la région qui interagit avec SNAP-25 et VAMP. De plus, l'expression de la septine 5 inhibe l'exocytose tandis que l'expression de la forme mutée de la septine 5 au niveau de son domaine GTPase favorise l'exocytose. Par ailleurs la co-expression de la forme mutée de la septine 5 avec la toxine de tétanos qui clive la VAMP abolit l'exocytose indiquant que l'effet la septine 5 a eu lieu avant l'étape nécessitant la protéine VAMP (Beites et al., 1999)(Beites et al., 2005). Enfin, la phosphorylation de septine 5 sur la Ser17 (Taniguchi et al., 2007) ou sur la Ser 327 (Amin et al., 2008) par les kinases Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) inhibe son interaction avec la syntaxine et favorise l'exocytose.

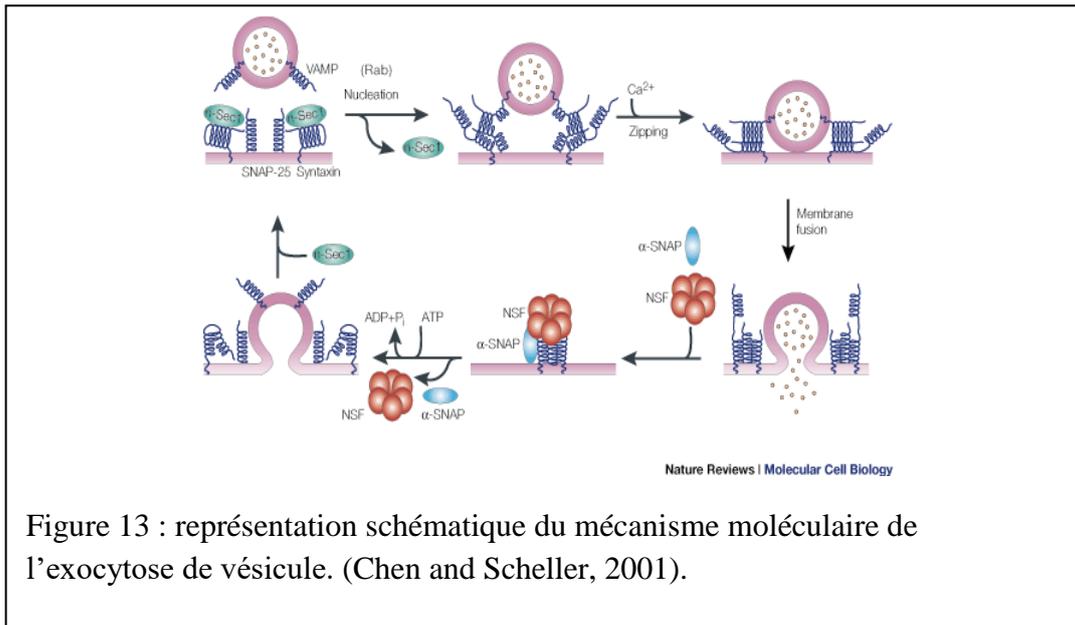
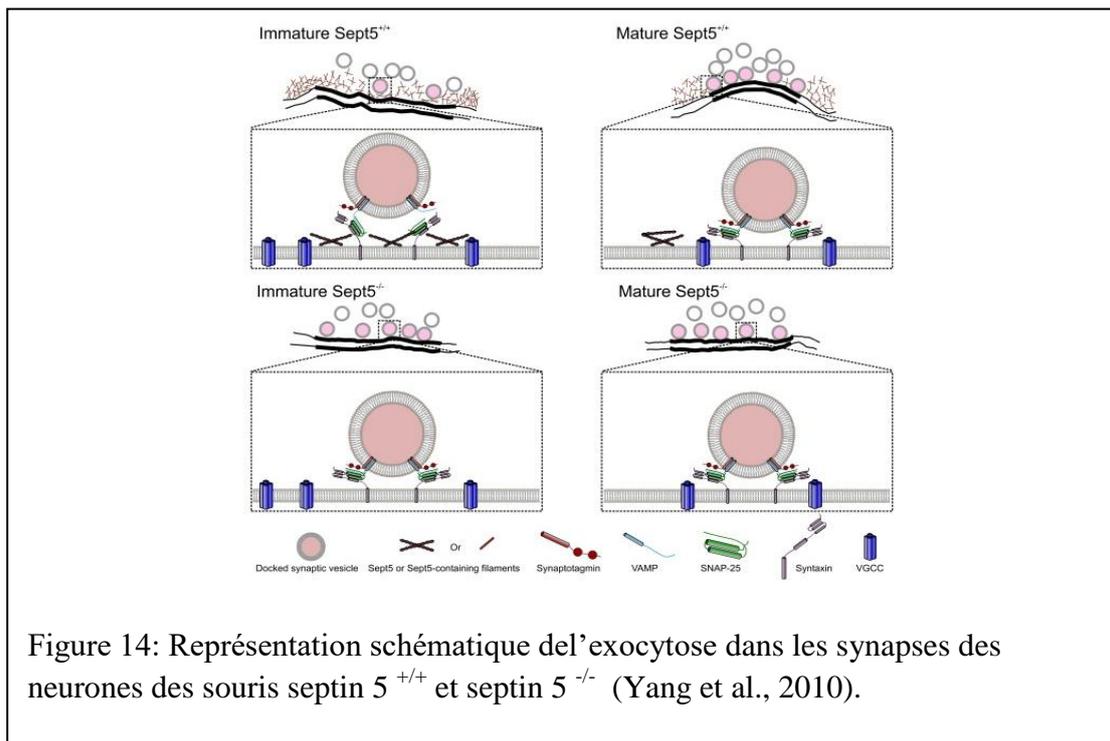


Figure 13 : représentation schématique du mécanisme moléculaire de l'exocytose de vésicule. (Chen and Scheller, 2001).

Chez les souris surexprimant la septine 5, Yang et ses collègues ont montré que cette septine agissait comme une barrière de séparation spatiale entre les vésicules et la zone active dans les synapses des neurones immatures inhibant ainsi leur fusion et empêchant l'exocytose. La maturation des neurones est accompagnée d'une diminution significative de la septine 5 ce qui permet l'attachement et la fusion des vésicules avec la zone active et donc l'exocytose est favorisée chez les souris septine 5<sup>+/+</sup>. Par contre, dans les synapses des neurones immatures et matures chez les souris septine 5<sup>-/-</sup>, la barrière de séparation est absente et les vésicules s'attachent et fusionnent avec la membrane de la zone active comme illustré dans la figure 14 (Yang et al., 2010).

Par ailleurs, malgré ces études, les résultats sur le rôle des septines dans l'exocytose sont controversés. Ihara et ses collègues ont montré que les souris Septine 4<sup>-/-</sup> présentent une neurotransmission dopaminergique diminuée (Ihara et al., 2007), ce qui indique un rôle favorisant l'exocytose contrairement au rôle inhibant de la septine 5. D'une autre part, aucun phénotype sur la transmission synaptique anormale n'a été observé chez les souris septine 6<sup>-/-</sup> (Ono et al., 2005) et septine 3<sup>-/-</sup> (Tsang et al., 2008).



D'une autre part Spiliotis et ses collègues ont montré que les filaments de septine 2 colocalisent avec les microtubules polyglutamylés dans les cellules épithéliales MDCK, et que les vésicules contenant des protéines marqueurs des membranes apicales ou basolatérales quittent le TGN et migrent sur les filaments de tubuline polyglutamylés associés à la septine 2. L'association de la septine 2 avec les filaments de tubuline polyglutamylée facilite donc le transport des vésicules en maintenant la polyglutamylation des microtubules et en empêchant la liaison des microtubules à MAP4. La déplétion de la septine 2 aboutit à la perte des microtubules polyglutamylés orientés verticalement et à l'accumulation intracellulaire des protéines marqueurs des membranes apicales et basolatérale et la perte de la polarité cellulaire. Ceci suggère que l'interaction de la septine 2 avec les microtubules est nécessaire pour le transport vésiculaire de Golgi à la membranes plasmique (Spiliotis et al., 2008).

Récemment, Tokhtaeva et ses collègues ont montré que la déplétion de la septine 2 ou l'inhibition de l'assemblage/désassemblage des hétéromères des septines (la dynamique des septines) par le forchlorfenuron (FCF), entraîne l'inhibition de l'exocytose des protéines indiquant que les septines subissent une organisation dynamique pour assurer des interactions variées au cours de l'exocytose avec des partenaires protéiques essentielles pour ce processus. (Tokhtaeva et al., 2015).

En conclusion, la majorité des études concernant le rôle des septines dans le trafic vésiculaire ont concerné le rôle des septines dans l'exocytose et ont suggéré que les septines peuvent réguler la disponibilité des vésicules pour l'exocytose à travers leurs interactions directes avec des protéines impliquées dans la fusion des membranes. A ce jour le rôle des septines dans le transport intracellulaire et les mécanismes moléculaires impliqués restent mal compris.

#### ➤ **La régulation des cils primaires**

Les cils primaires sont des protrusions non motiles présentés à la surface de la plupart des cellules eucaryotes. Le cil primaire découle d'une structure dérivée du centriole appelée le corps de base (basal body) et l'axonème du cil qui est composé des microtubules organisés en anneau cylindrique. La composition unique des cils leur permet d'agir comme une antenne de la cellule, capable de détecter les changements dans l'environnement comme l'écoulement de fluide, la pression, la lumière, et les odeurs.

Il a été montré que la déplétion de la septine 2 conduit à une mauvaise localisation des protéines de la membrane ciliaire et aboutit à une ciliogenèse inhibée. De plus, les septines forment une barrière de diffusion à la base du cil primaire pour maintenir la distribution des protéines de la membrane ciliaire (Hu et al., 2010).

Des études antérieures ont suggéré que les septines régulent la fonction de MAP4 (Kremer et al., 2005) Ghossoub et ces collègues ont décrit la localisation de MAP4 dans l'axonème, et montré que la déplétion de MAP4 aboutissait à des cils plus longs. De plus, la surexpression de MAP4 déplace les septines du cil primaire. Ceci a conduit à proposer que la croissance des cils est régulée par la compétition entre MAP4 et les septines (Ghossoub et al., 2013).

### **7.1.8. Maladies associées aux septines**

Vu leurs nombreuses fonctions il n'est pas surprenant que les septines soient associées à des nombreuses maladies.

#### ➤ **L'amyotrophie névralgique héréditaire (ANH)**

L'amyotrophie névralgique héréditaire (ANH) est une neuropathie autosomique dominante rare caractérisée par l'apparition d'une douleur dans l'épaule et/ou le bras ainsi qu'à une faiblesse, une perte sensorielle, et une atrophie des muscles des bras. L'analyse génétique de plusieurs patients a identifié des mutations dans le locus du gène *SEPT 9*

(Kuhlenbäumer et al., 2005). Deux mutations de substitution R88W et S93F dans la partie N-terminale des variants de la septine 9 (i1, i2, i3) ont été trouvées (Hannibal et al., 2009). Des duplications englobant le gène la septine 9 ont également été détectées chez ces patients et dans tous les cas étudiés la région dupliquée comprend l'exon contenant la mutation R88W et S93F. Il a été démontré que la mutation R88W se localise à la première arginine du motif répété R-R-x-E, qui est impliqué dans l'interaction de la septine 9 avec les microtubules (Bai et al., 2013).

➤ **La stérilité mâle**

La perte de septine 4 chez des mâles infertiles a été reportée mais la cause de cette perte n'est pas encore connue (Lhuillier et al., 2009). Il a aussi été montré que le niveau d'expression de la septine 12 était important pour le développement des spermatozoïdes (Lin et al., 2009) et des mutations de cette protéine aboutissent à la stérilité des mâles (Kuo et al., 2012).

➤ **Le cancer**

❖ **Les cancers associés aux septines**

▪ **La leucémie**

MLL (*mixed lineage leukemia*) est un gène qui code pour une *histone-lysine N-methyltransferase*. Cette protéine est impliquée dans la régulation positive de la transcription des gènes. MLL s'est localisé sur le chromosome 11q23 et ce locus est fréquemment impliqué dans les translocations chromosomiques associées aux leucémies. Alors que plus de 60 translocations différentes du gène MLL ont été identifiées, 5 d'entre elles impliquent des membres de la famille des septines. Ces translocations provoquent une variété de leucémies aiguës y compris la leucémie lymphoblastique aiguë, la leucémie myéloïde aiguë, la leucémie des neutrophiles polynucléaires chronique, et plusieurs autres (Fung et al., 2014).

La première évidence d'une contribution des septines dans la néoplasie vient de la découverte de la septine 5 comme partenaire de fusion en C-terminal de MLL chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigue ayant une translocation t(11;22)(q23;q11.2) (Megonigal et al., 1998). Par la suite, les septines 9, 6, 2 et 11 ont également été identifiées comme des partenaires de fusion avec MLL dans des cellules leucémiques humaines (Osaka et al., 1999)(Borkhardt et al., 2001); (Kojima et al., 2004)(Cerveira et al., 2006).

### ▪ **Le lymphome**

La septine 9 est également associée au lymphome puisqu'elle a été identifiée comme un locus ciblé par le virus SL3-3 (*T-cell lymphoma inducing virus SL3-3*) induisant le lymphome des cellules T chez la souris. L'association fréquente d'insertion dans le locus de la septine 9 des lymphomes T conduit à la suggestion que le locus septine 9 peut être un proto-oncogène (Sorensen et al., 2000).

### ▪ **Le cancer colorectal**

Des modifications dans l'expression des variants de la septine 9 ont été observées dans le cancer colorectal. Plus précisément, l'expression du variant 1 de septine 9 est diminuée au niveau de l'ARNm, tandis que l'expression des variants 2, 4, 4\*, 5 est augmentée dans les cellules épithéliales cancéreuses des patients. La diminution de l'expression de la septine 9 est probablement due à la méthylation dans le promoteur du gène *SEPT 9* ce qui diminue sa transcription. Ainsi, un traitement des cellules avec des agents de déméthylation conduit à une augmentation de l'ARNm et de l'expression de protéine (Tóth et al., 2011).

Cette modification de l'expression de la septine 9 basée sur la méthylation de son promoteur a été utilisée pour développer un test de dépistage de cancer du côlon (Lofton-Day et al., 2008). Actuellement, le test basé sur la détection de la méthylation du gène *SEPT 9* dans le sang est devenu une option potentielle avec avenir prometteur pour la détection précoce et le dépistage du cancer colorectal (Li et al., 2014).

### ▪ **Les cancers du sein et des ovaires**

La septine 9 a également été impliquée dans le cancer du sein et des ovaires. Le locus sept9 humain a été considéré comme un « *hot spot* » pour les modifications alléliques dans le cancer de l'ovaire et du sein (Kalikin et al., 2000)(Russell et al., 2000). En fait, l'amplification de ce locus a été observée dans des lignées cellulaires de cancer du sein humain et de souris (Montagna et al., 2003) et au cours de la progression tumorale (Connolly et al., 2011). Bien qu'aucune mutation n'ait été trouvée dans la séquence codante du gène, une variation au niveau d'expression et des variants spécifiques ont été observés (Montagna et al., 2003)(Gonzalez et al., 2007).

### ▪ **Le carcinome épidermoïde de la tête et du cou**

Plusieurs septines ont été associées au carcinome épidermoïde de la tête et du cou comme les septines 1, 3, 6, 9, 11 et 14 (Fung et al., 2014). Par ailleurs, une expression élevée du variant 1 de la septine 9 a été associée à un mauvais pronostic de ce cancer (Stanbery et al.,

2010). Le promoteur de *sept 9* est souvent méthylé dans cette maladie (Bennett et al., 2008) ce qui suggère que, comme dans le cancer du sein et du colon, des altérations dans l'expression des variants de la septine 9 peuvent contribuer à des phénotypes malins.

#### ❖ **Liens mécanistiques possibles entre les septines et le cancer**

##### ▪ **Aneuploïdie**

Une hypothèse émise depuis longtemps sur la tumorigenèse est que l'échec de la division cellulaire pourrait générer des cellules tétraploïdes génétiquement instables, et faciliter le développement de tumeurs malignes aneuploïdes (Fujiwara et al., 2005). Au vu du rôle des septines dans la division cellulaire et la ségrégation des chromosomes détaillées plus haut, il semble possible qu'un lien existe entre les défauts dans ces fonctions et le développement de tumeurs malignes aneuploïdes (Fung et al., 2014).

##### ▪ **Métastase**

Les septines pourraient contribuer à la progression des métastases à travers leur rôle dans la migration cellulaire. Il a été démontré que septine 9 était impliquée dans la formation des pseudopodes de cellules épithéliales métastatiques. De plus, la déplétion de la septine 9 inhibe la migration et l'invasion cellulaire, provoque le retrait des pseudopodes ainsi la diminution de dynamique de l'actine et l'induction de la transition mésenchymateuse-épithéliale (Shankar et al., 2010). Le lien entre septine 9 et la migration cellulaire est complexe car des variants spécifiques de septine 9 peuvent être impliqués. Chacko et ses collègues ont montré que la surexpression de la variant 4 de septine 9 modifie l'organisation de l'actine, augmente la production des pseudopodes autour de la cellule, et augmente la motilité cellulaire (Chacko et al., 2005). Egalement, le variant 1 de la septine 9 augmente la motilité cellulaire (Gonzalez et al., 2007)(Connolly et al., 2011).

##### ▪ **Angiogenèse**

Un des rôles des septines dans les cancers pourrait-être de favoriser l'angiogenèse par activation de la voie de HIF-1  $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor-1*).

Dans des conditions de faibles niveaux d'oxygène, le HIF-1, qui est un facteur de transcription est transporté dans le noyau pour activer la transcription des facteurs importants pour l'angiogenèse. Le variant 1 de la septine 9 se lie spécifiquement à HIF-1  $\alpha$  et peut promouvoir son activité *in vitro* et *in vivo* (Amir et al., 2006). Le renforcement de cette voie provoque à la fois l'augmentation de activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  et la stabilisation de la protéine (Amir et al., 2009)(Amir et al., 2010). De plus, il a été montré que le variant 1 de

la septine 9 est nécessaire pour l'association entre HIF-1 $\alpha$  et l'importine- $\alpha$  pour promouvoir une translocation nucléaire efficace de la HIF-1  $\alpha$  (Golan and Mabeesh, 2013). Par conséquent, les septines jouent un rôle dans les cancers par la favorisation de l'angiogenèse par l'activation de la voie de HIF-1  $\alpha$  (Fung et al., 2014).

#### ▪ Apoptose

Le variant 2 de la septine 4, également appelé ARTS (*apoptosis-related protein in the TGF- $\beta$  signalling pathway*), a été détecté comme une protéine de la voie de l'apoptose dans la signalisation TGF- $\beta$  (Larisch et al., 2000). Cette protéine a été impliquée dans la voie apoptotique par son interaction avec l'IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*). L'inhibition d'IAP par ARTS conduit à l'activation de certaines caspases (Gottfried et al., 2004) et finalement à l'apoptose. Dans des leucémies humaines ARTS est sous-exprimé (García-Fernández et al., 2010), ce qui relie cette septine au cancer.

#### ➤ Les maladies infectieuses

Les septines ont été impliquées dans plusieurs maladies infectieuses comme l'infection par des bactéries, des champignons ou des virus comme par exemple le virus de l'hépatite C.

#### ❖ L'infection par des pathogènes bactériens

Plusieurs pathogènes bactériens peuvent causer des maladies en entrant dans les cellules non phagocytaires. Quelques-uns d'entre eux, y compris *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) et *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), sont capables d'exploiter le cytosquelette d'actine de l'hôte et de l'utiliser pour leur propre motilité à la fois intra et intercellulaire (Welch and Way, 2013). Ces bactéries invasives développent des queues d'actine longues dans le cytosol de l'hôte. Fait intéressant, les septines forment une cage autour des queues d'actine et entourent l'organisme bactérien (Mostowy et al., 2010), (Mostowy and Cossart, 2012). Ces cages de septines peuvent servir à empêcher la motilité actine dépendante de la bactérie et à limiter la diffusion des agents pathogènes invasifs. Par ailleurs, les bactéries cytosoliques telles que *S. flexneri*, peuvent être ciblées pour l'autophagie après s'être enfermées dans les cages des septines. La déplétion de la septine 2, la septine 9, ou celle des composants clés de la voie de l'autophagie, tels que p62, *nuclear dot protein 52 kDa* (NDP52), *autophagy-related 5* (ATG5), ATG6 or ATG7 amène à l'échec de l'accumulation des marqueurs de l'autophagie (Mostowy et al., 2011b)(Mostowy et al., 2010). Pour cela les cages des septines pourraient représenter un mécanisme de défense de l'hôte (Mostowy and Cossart, 2012).

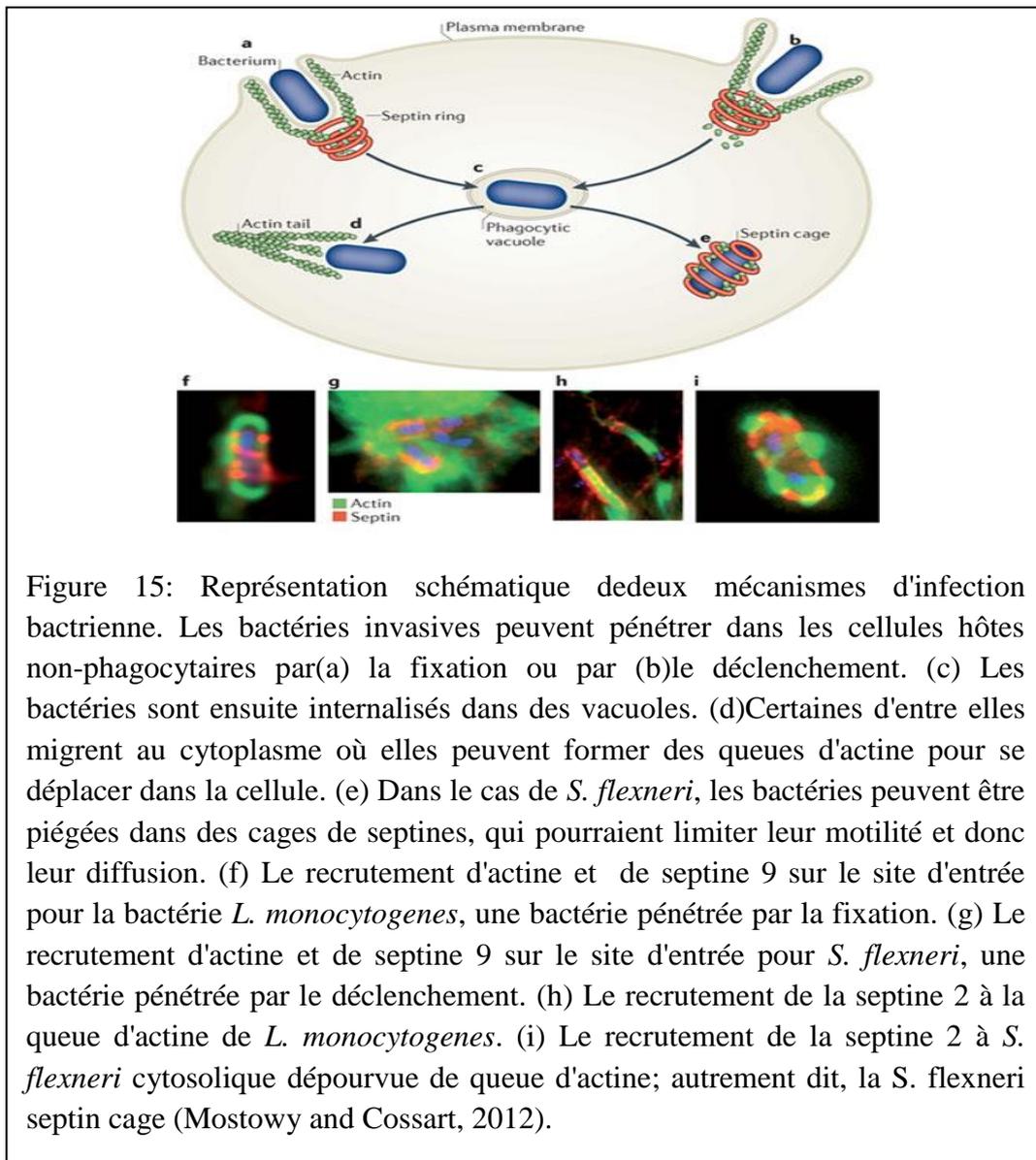


Figure 15: Représentation schématique de deux mécanismes d'infection bactérienne. Les bactéries invasives peuvent pénétrer dans les cellules hôtes non-phagocytaires par (a) la fixation ou par (b) le déclenchement. (c) Les bactéries sont ensuite internalisées dans des vacuoles. (d) Certaines d'entre elles migrent au cytoplasme où elles peuvent former des queues d'actine pour se déplacer dans la cellule. (e) Dans le cas de *S. flexneri*, les bactéries peuvent être piégées dans des cages de septines, qui pourraient limiter leur motilité et donc leur diffusion. (f) Le recrutement d'actine et de septine 9 sur le site d'entrée pour la bactérie *L. monocytogenes*, une bactérie pénétrée par la fixation. (g) Le recrutement d'actine et de septine 9 sur le site d'entrée pour *S. flexneri*, une bactérie pénétrée par le déclenchement. (h) Le recrutement de la septine 2 à la queue d'actine de *L. monocytogenes*. (i) Le recrutement de la septine 2 à *S. flexneri* cytosolique dépourvue de queue d'actine; autrement dit, la *S. flexneri* septin cage (Mostowy and Cossart, 2012).

#### ❖ L'infection par *Candida albicans* (*C. albicans*).

L'actine et la N-cadhérine sont les récepteurs de surface cellulaire sur lesquels se lie *C. albicans* pour son internalisation. La septine 7 humaine est co-localisée avec les microfilaments d'actine et la N-cadhérine autour *C. albicans* lors de son endocytose par les cellules endothéliales. Il a été suggéré qu'en réponse à l'infection par *C. albicans*, la septine 7 forme un complexe avec la N-cadhérine d'une manière dépendante de l'actine, ce complexe serait nécessaire pour l'accumulation de la N-cadhérine autour des hyphes de *C. albicans*, pour une endocytose maximale (Phan et al., 2013).

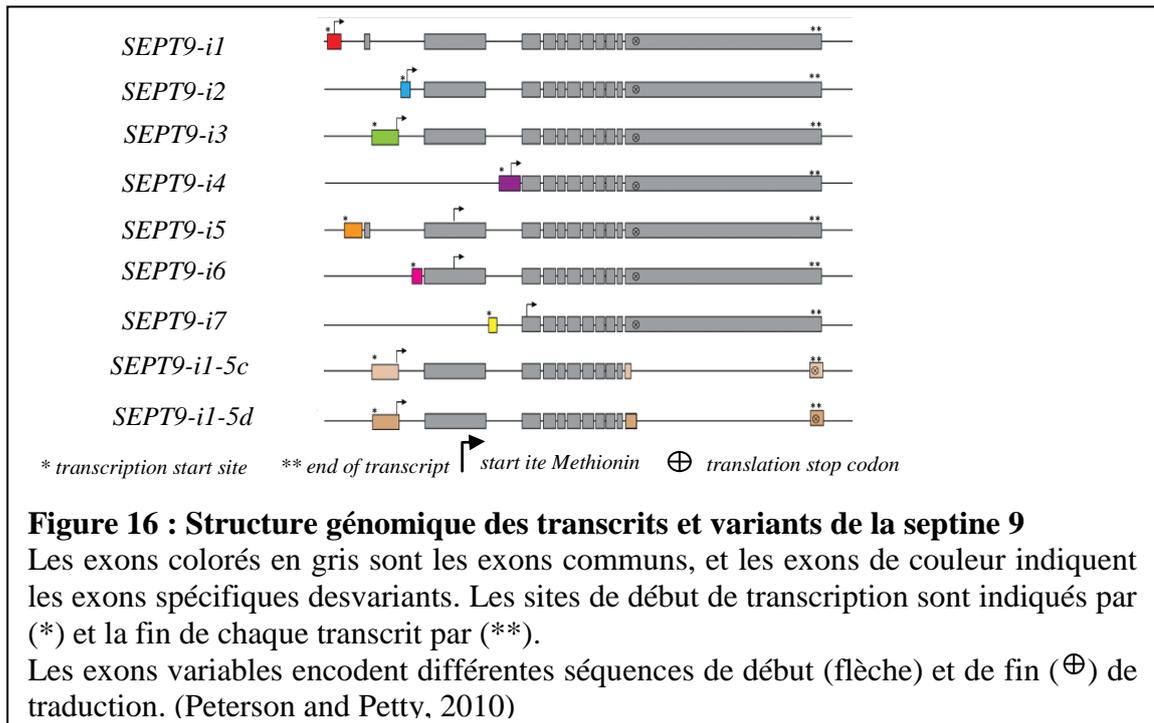
### ❖ L'infection par VHC

En utilisant la technique de double-hybride Kim et ses collègues ont identifié la septine 6 et hnRNP A1, une protéine de liaison avec l'ARN qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme, comme des partenaires de la polymérase virale du VHC, la protéine NS5B (*non structural protein5b*). Ils ont montré également que la septine 6 interagissait directement avec hnRNP A1 ce qui suggère que NS5B, septine 6 et hnRNP A1 forment un complexe. Kim et ces collègues ont proposé le mécanisme suivant : Etant donné que l'hnRNP A1 est une protéine de liaison à l'ARN, elle peut diriger le complexe de réplication, contenant NS5B, septine 6, et lui-même, à la région appropriée de l'ARN génomique du VHC. En fait, l'interaction de hnRNP A1 avec les régions NTR 3' des sens positif et négatif des ARNs viraux peut diriger le complexe de réplication sur les sites où la réplication est initiée. La septine 6 peut fonctionner comme une molécule d'échafaudage pour faire la liaison entre NS5B et hnRNP A1, qui est à son tour est associé à l'ARN viral (Kim et al., 2007).

#### 7.1.9. La Septine 9

La septine 9, dont l'implication a été démontrée à la fois dans le cancer et les troubles neurologiques, illustre très bien la diversité de locus des septines humaines. L'intérêt grandissant pour la septine 9 a commencé après qu'elle ait été mise en évidence comme un partenaire de translocation de MLL dans la leucémie (Osaka et al., 1999). Le gène *SEPT 9* a ensuite été cartographié sur le chromosome 17q25, dans une région liée aux cancers mammaires et ovariens (Kalikin et al., 2000)(Kalikin et al., 1997)(Russell et al., 2000), suggérant le rôle important que pourrait jouer cette septine non seulement dans les leucémies mais aussi dans les cancers du sein et de l'ovaire. Par la suite, il a été montré que le locus de la septine 9 donnait lieu à des multiples transcrits alternatifs codant au moins six variants (Kalikin et al., 2000). Le locus de la septine 9 contient 13 exons et montre une grande variabilité aux extrémités 5' et 3' soit par un épissage alternatif des exons ou par des différents sites de début de transcription (Figure 16). Ces variants maintiennent la structure générale des septines, avec une région centrale très conservée contenant le domaine polybasique et le domaine de liaison au GTP. Elles varient en 5' et 3'-NTR du transcrit, et en N-ter et C-ter de la protéine. De manière intéressante, les transcrits septine 9\_v4\* et septine 9\_v4 codent exactement pour la même protéine, mais diffèrent par leur extrémité 5'-NTR, suggérant que ces transcrits sont probablement différenciellement régulés au cours du temps

ou d'une manière dépendante des tissus (Burrows et al., 2003)(Scott et al., 2005)(Scott et al., 2006).



La septine 9 est exprimée de façon ubiquitaire même si des variants individuelles peuvent avoir une expression tissu-spécifique (Kalikin et al., 2000). La localisation cellulaire des isoformes de la septine 9 est largement cytoplasmique dans les cellules pendant l'interphase, mais le variant 1 possède une localisation nucléaire bipartite qui pourrait diriger la navette de ce variant entre le noyau et le cytoplasme. Dans les cellules en mitose, la septine 9 montre un marquage ponctiforme entre les chromosomes en séparation, et au niveau du sillon de clivage lors de la télophase (Surka et al., 2002). La septine 9 variant 1 se retrouve localisée au niveau du réseau de microtubules dans les cellules en interphase, et au niveau des faisceaux de microtubules de fuseau mitotique dans les cellules en mitose (Nagata et al., 2003). Ces deux études montrent que des cellules déplétées en septine 9 deviennent binucléées, suggérant un rôle pour cette septine dans la division cellulaire via l'interaction entre les composants du cytosquelette comme les tubulines. La dérégulation de l'expression des différents variants de la septine 9 contribue différemment à la progression du cancer. Par exemple, en favorisant la migration des cellules, la surexpression de septine 9 variant 4 est reliée à des propriétés métastatiques (Chacko et al., 2005)(Chacko et al., 2012), tandis que la surexpression de septine 9 variant 1 en inhibant l'action des médicaments déstabilisant les microtubules peut favoriser la survie des cellules cancéreuses après une chimiothérapie (Amir and Mabjeesh, 2007).

## 7.2. Phosphoinositides (PIs)

Les phosphoinositides (PIs), sont des glycérophospholipides qui représentent environ 10-15% des phospholipides membranaires. Ils sont composés de deux acides gras, essentiellement l'acide stéarique (C18: 0) en position 1 et l'acide arachidonique (C20: 4) en position 2, mais d'autres espèces moléculaires mineures coexistent dans la plupart des cellules. Ces acides gras sont liés à un squelette de glycérol, qui est relié à une molécule d'inositol par une liaison phosphodiester (Figure 17).

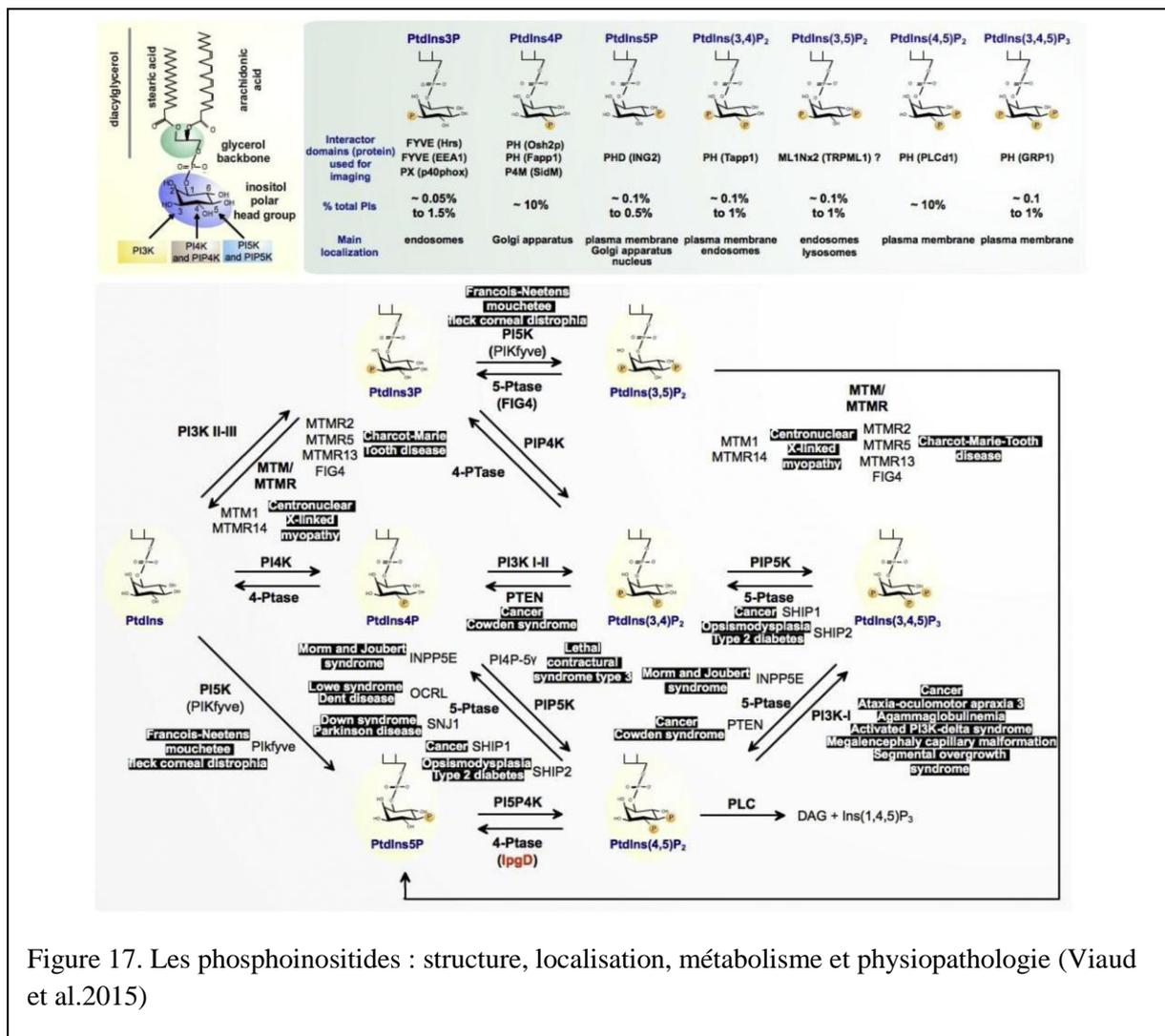


Figure 17. Les phosphoinositides : structure, localisation, métabolisme et physiopathologie (Viaud et al.2015)

Malgré la présence de cinq groupes hydroxyles libres au niveau du noyau d'inositol, seules les positions 3, 4 et 5 sont phosphorylées par des kinases spécifiques. En fait, l'encombrement stérique empêcherait l'accès aux positions 1 et 6 par les kinases. Ainsi, en plus des phosphatidylinositol (PtdIns) représentant 80% de la quantité totale des PIs, 7 autres

PIs ont été identifiés, correspondant aux diverses combinaisons de phosphorylation de l'inositol. Les PtdIns4P et PtdIns (4,5) P2 représentent ~ 10% du total des PIs tandis que les autres espèces ne représentent pas plus de 1% à 2%. Les différents PIs sont générés par une famille de phosphatidylinositol kinases et une famille de phosphatases (Fig.25)

### 7.2.1. Les phosphoinositides et leurs fonctions cellulaires

#### ➤ PtdIns3P

Le PtdIns3P, présents en petites quantités dans les cellules eucaryotes, est principalement produit par la phosphorylation des PtdIns par les Phosphatidylinositol Kinases PI3K classe I (PI3KI), class II (PI3KII) et class III (PI3KIII). Ils sont également produits par la déphosphorylation de PtdIns (3,4) P2 par une phosphatase de type I  $\alpha$  4-phosphatase, et de PtdIns (3,5) P2 par une 5-phosphatase appelée FIG4 (*Factor-Induced Gene 4*) ou Sac3 (Stenmark and Gillooly, 2001).

La majeure partie de ce lipide est localisée sur les membranes internes et externes des endosomes, mais il peut également être détecté dans les membranes des phagosomes, des précurseurs d'autophagosome, de la membrane plasmique et de la membrane du noyau (Schink et al., 2013).

Le PtdIns3P contrôle des fonctions cellulaires par le recrutement d'effecteurs protéiques spécifiques, dont beaucoup contiennent le domaine FYVE ou PX (*Phox Homology*). Le PtdIns3P et ses effecteurs contrôlent des processus cellulaires comme:

- Le trafic intracellulaire : la fusion des endosomes, le recyclage des vésicules à la membrane plasmique et au TGN, tri des vésicules au lysosomes (Schink et al., 2013)
- L'autophagie : la maturation des autophagosomes par le recrutement des protéines de la famille Atg-18 (WIPI 1 et 2) (Proikas-Cezanne et al., 2015)
- L'activation de p40phox, un composant de la NADPH oxydase pour activer la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les phagosomes (Ellson et al., 2006).

#### ➤ PtdIns4P

Le PtdIns4P est l'un des plus abondants PI. Il est présent principalement dans l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique, mais on le trouve aussi dans les endosomes et dans le TGN.

Chez les mammifères la production de PtdIns4P est assurée par deux PI4K classe II (PI4K II  $\alpha$  et  $\beta$ ) et deux PI4K classes III (PI4KIII  $\alpha$  et  $\beta$ ). Le PtdIns4P régule le transport vésiculaire à partir de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique et les endosomes. Ainsi, ce lipide assure plusieurs fonctions y compris:

- Le PtdIns(4) P est accumulé au niveau de l'appareil Golgi et joue un rôle dans le maintien de la morphologie de l'appareil Golgi et dans le trafic cellulaire. En effet, le PtdIns(4)P lie la protéine GO4PH3 de l'appareil Golgi d'une part, et la myosine MYO18A du cytosquelette d'actine d'autre part, créant ainsi un pont entre la membrane de l'appareil Golgi et le cytosquelette d'actine, stabilisant la morphologie de l'appareil Golgi (Dippold et al., 2009).
- La localisation des enzymes résidant dans l'appareil Golgi : En effet, la protéine Vps74 de levure, qui se localise dans l'appareil de Golgi par une liaison avec PtdIns4P et ARF, se lie à et est nécessaire pour le maintien des glycosyltransférases qui se trouvent dans les compartiments médial et cis de l'appareil Golgi (Schmitz et al., 2008)(Wood et al., 2009). La GOLPH3 est l'orthologue de Vps74 chez les mammifères et est nécessaire pour la rétention de 2 *N-acetylglucosaminyltransferase* dans l'appareil Golgi (Ali et al., 2012).
- La formation des vésicules en induisant la déformation de la membrane (D'Angelo et al., 2008)
- Le tri des protéines des endosomes (en interagissant avec la protéine adaptateur de clathrine, GGA2, qui à son tour interagit avec Arf1 pour un recrutement efficace (Demmel et al., 2008).
- Le transport des protéines à partir du TGN à la membrane plasmique (qui implique le recrutement et l'activation de Sec2, une GEF (*Guanine nucleotide- exchange factors*) de protéines Rab. (Mizuno-Yamasaki et al., 2010).

#### ➤ **PtdIns5P**

Le PtdIns5P est le dernier PI identifié. Il est présent en faible quantité dans les cellules quiescentes. Ce lipide peut être synthétisé par la phosphorylation de PtdIns par la 5-kinase PIKfyve mais aussi par la déphosphorylation de PtdIns (3,5) P<sub>2</sub> par la 3-phosphatases de la famille des myotubularines. Bien que jamais clairement démontré, il peut également être généré par la 4-phosphatase type II de mammifère agissant sur PtdIns (4,5) P<sub>2</sub>. A l'inverse, il

a été montré que le PtdIns5P est spécifiquement phosphorylé par PI4K II  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) pour produire le PtdIns (4,5) P2 (Viaud et al., 2015). Le niveau de PtdIns5P augmente à la suite de stimuli spécifiques (thrombine, l'insuline, stress osmotique, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV, infection bactérienne) (Viaud et al., 2014a). Le PtdIns5P est localisé à la membrane plasmique et dans des compartiments intracellulaires (y compris le réticulum endoplasmique, Golgi et les vésicules à très faible densité) (Sarkes and Rameh, 2010).

Les fonctions associées à l'augmentation PtdIns5P sont différentes en fonction de la localisation de ce lipide.

- La fonction la mieux caractérisée correspond au PtdIns5p nucléaire qui a été décrit comme un élément de réaction au stress. Dans le noyau, PtdIns5P module l'expression de gènes par interaction avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. PtdIns5P interagit notamment avec le domaine de PHD (*Pleckstrin homology domain*) de ING2, qui est couramment utilisé comme une sonde pour la détection de ce lipide par l'imagerie (Gozani et al., 2003).
- Il a été démontré que le facteur de virulence de *S. flexneri*, IPGD (*Invasion plasmidic gene D*), possède une activité 4-phosphatase de PtdIns (4,5) P2 qui produit des quantités significatives de PtdIns5P dans la cellule hôte après l'infection. Par la suite, le PtdIns5P généré au niveau des sites d'entrée de la bactérie, module la dynamique de membrane et des signaux intracellulaires de la cellule hôte (Niebuhr et al., 2002). Il induit l'accumulation, l'activation sans ligand et la stabilisation d'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) en affectant le trafic de lysosomes, activant ainsi la signalisation de la survie de la cellule hôte pour le bénéfice des bactéries (Pendaries et al., 2006)(Ramel et al., 2011).
- De plus, cette augmentation du PtdIns5P à la membrane plasmique aboutit à la fermeture des hémicanaux de connexines (*connexin hemichannels*), qui libèrent normalement l'ATP dans le milieu extracellulaire pour activer la réaction inflammatoire contre le pathogène (Puhar et al., 2013). Donc, la bactérie pathogène utilise le PtdIns5P pour détourner la machinerie moléculaire de cellule hôte à son profit.
- Il a été démontré que la stimulation du récepteur T (TCR) dans les lymphocytes T induit une augmentation de PtdIns5P, qui à son tour recrute la

famille des protéines DOK (*Downstream of Tyrosine Kinases*) pour promouvoir leur phosphorylation et pour activer la boucle de rétrocontrôle négative (*negative feedback loop*) pour contrôler le niveau de PtdIns5P (Guittard et al., 2009).

- La stimulation des adipocytes par l'insuline induit également une production maximale de PtdIns5P entraînant la perte de fibres de stress d'actine et de l'accélération de la relocalisation (*translocation*) du transporteur de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique (Sbrissa et al., 2004)
- Le PtdIns5P coordonnerait la dynamique membranaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine. En effet, l'augmentation de PtdIns5P entraîne le recrutement et l'activation de la GEF Tiam1 qui interagit directement par son domaine PH en C-terminal avec le PtdIns5P. Cette interaction conduit à l'activation de Rac1 qui induit une forte dynamique de la membrane associée à l'actine pour favoriser la motilité cellulaire et l'invasion (Viaud et al., 2014b).
- Une étude plus récente a montré que le PtdIns5P régule l'autophagie positivement et indépendamment de la voie canonique impliquant Vps34 et PtdIns3P (Vicinanza et al., 2015).

#### ➤ **PtdIns(3,4)P2**

Ce PI est produit à la membrane plasmique de la cellule lors de la déphosphorylation de PtdIns(3,4,5)P3 par les 5-phosphatases SHIP1, SHIP2 (*SH2-containing inositol 5'-phosphatase*) et SKIP (*Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase*). De plus, les PI3K de classe II produisent à partir de PtdIns4P un pool de PtdIns(3,4)P2 qui contrôle l'endocytose dépendante de la clathrine (Posor et al., 2013). Les fonctions spécifiques de PtdIns(3,4)P2 sont encore mal connues et seuls quelques effecteurs ont été identifiés. Cependant, certaines publications attribuent des fonctions importantes de ce lipide dans divers processus cellulaires, en plus de son rôle dans l'endocytose. Ceux-ci comprennent:

- La régulation négative de la signalisation de l'insuline par une interaction directe avec le domaine PH de TAPP1 et 2 (*Tandem PH (pleckstrin homology)-domain-containing protein 1 and 2*) (Wullschleger et al., 2011).
- L'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptors*) à travers un processus impliquant SHIP1 et SHIP2 qui produisent les PtdIns(3,4)P2 sur la membrane plasmique ce qui amène le recrutement de la

lamellipodine via son domaine PH. La lamellipodine à son tour engage l'endophiline qui est une composante de l'endocytose dépendante de la clathrine (Boucrot et al., 2015).

- Notre groupe a montré que la phosphatase SHIP2 et son produit lipidique le PtdIns(3,4)P2 sont localisés à la membrane basale des cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney) polarisées en culture 3D sur le Matrigel. Nos résultats ont démontré aussi que SHIP2, par son activité catalytique, joue un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité apico-basale. Les cellules traitées par des siARN spécifiques de SHIP2, et les cellules exprimant une forme mutée de SHIP2 dépourvue de son activité catalytique, et cultivées en 3D montrent un phénotype multilumières des cystes, en comparaison avec les cellules contrôles avec une monocouche cellulaire polarisée et une lumière unique centrale. On observe aussi une diminution significative de l'expression des protéines du complexe basolatéral de la polarité cellulaire, les protéines Dlg1 et Scribble. L'ensemble de ces résultats ont montré ainsi le rôle clé de SHIP2 dans la polarité cellulaire (Awad et al. 2013).

#### ➤ **PtdIns(3,5)P2**

Le PtdIns (3,5) P2 représente environ 0,04% des phosphatidylinositols totaux (Zolov et al., 2012). Le PtdIns (3,5) P2 est synthétisé principalement par la phosphorylation de PtdIns3P par la 5-kinase PIKfyve. PIKfyve opère dans un complexe protéique appelé PAS (PIKfyve / ArPIKfyve / Sac3). PAS a la capacité de produire de manière réversible PtdIns (3,5) P2 en raison de la présence de la 5-phosphatase Sac3, qui hydrolyse le PtdIns (3,5) P2 en PtdIns3P (McCartney et al., 2014). Ce complexe kinase / phosphatase est localisé sur les endosomes, en raison de l'interaction du domaine FYVE de PIKfyve avec PtdIns3P (Sbrissa et al., 2002). Une autre voie importante du métabolisme de PtdIns (3,5) P2 implique les 3-phosphatases de la famille des myotubularines, qui produisent PtdIns5P par déphosphorylation de PtdIns (3,5) P2 (Hnia et al., 2012).

- La déplétion ou l'inhibition du complexe PAS a montré que ces enzymes et les PtdIns (3,5) P2 sont impliqués dans l'homéostasie du trafic des endosomes. PtdIns (3,5) P2 régule la fission et la fusion des endosomes (de Lartigue et al., 2009), le transport rétrograde des endosomes vers TGN et le tri des vésicules vers les endosomes tardifs (Zhang et al., 2007).

Cependant, le manque d'outils pour localiser le PtdIns (3,5) P2 et pour bloquer spécifiquement sa signalisation représentent des limitations importantes pour obtenir une meilleure connaissance de ses fonctions. Les données actuelles suggèrent que PtdIns3P, PtdIns5P et PtdIns (3,5) P2 sont très connectés et que l'interconversion entre ces lipides pourrait être la base de la régulation et de la coordination de la dynamique du cytosquelette et du trafic vésiculaire (Viaud et al., 2015).

#### ➤ **PtdIns(4,5)P2**

Aussi abondant que PtdIns4P, ce lipide est principalement présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique. PtdIns (4,5) P2 a aussi été trouvé dans l'appareil de Golgi, dans les endosomes, dans le réticulum endoplasmique et dans le noyau.

Six kinases différentes contrôlent sa biosynthèse :

- PI5K I  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  utilisent PtdIns4P comme substrat et produisent la majorité des PtdIns (4,5) P2.
- PI4K II  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  phosphorylent PtdIns5P à la position 4 pour produire une quantité mineure, mais probablement très localisée, de PtdIns (4,5) P2.

Historiquement, les premiers rapports concernant ce lipide ont mis en évidence qu'il était le substrat de la phospholipase C (PLC), qui, lors de l'activation cellulaire, produit le second messager inositol triphosphate (Ins (1,4,5) P3) et diacylglycérol (DAG). D'ailleurs, il est maintenant bien établi que PtdIns (4,5) P2 interagit directement avec des protéines par des domaines spécifiques comme les domaines PH, ENTH (*epsin N-terminal homology*), FERM (*4.1, ezrin, radixin, moiesin*). Grâce à ces interactions, il module plusieurs régulateurs d'actine, et des canaux ioniques. PtdIns (4,5) P2 est donc un lipide très important, directement ou indirectement impliqué dans diverses fonctions biologiques y compris l'endocytose, l'exocytose, le trafic vésiculaire, la migration cellulaire et la polarité cellulaire (Kierbel et al., 2007)(Sun et al., 2013)(Viaud et al., 2015).

#### ➤ **PtdIns(3,4,5)P3**

PtdIns (3,4,5) P3 est un second messager lipidique. Il est présent en très faible quantité dans les cellules quiescentes. PtdIns (3,4,5) P3 est produit rapidement et de façon transitoire par l'activation des PI3K I après activation des différents récepteurs membranaires (Salamon and Backer, 2013). PtdIns (3,4,5) P3 est principalement produit dans le feuillet interne de la membrane plasmique où il recrute et active les protéines contenant le domaine PH, y compris la protéine Akt (Vasudevan and Garraway, 2010). Parmi les différentes protéines contenant le

domaine PH et recrutées par ce lipide on peut noter les EGF Arf (ARNO et GRP1) ou Rac (PREX1 et Vav) (Viaud et al., 2012), des tyrosines kinases telles que Btk. En résumé, ce lipide est fortement impliqué dans la formation et l'organisation des complexes de signalisation intracellulaire qui régulent la prolifération, la survie cellulaire, l'homéostasie du glucose ainsi que d'autres processus tels que la polarité cellulaire (Gassama-Diagne et al., 2006)(Kierbel et al., 2007). Récemment, notre groupe a également montré que chacun des membres de la classe I des PI3K régule la morphogénèse des cellules, mais seul le blocage de la PI3K delta empêche la formation de la lumière et conduit à l'inversion de la polarité cellulaire des cellules MDCK cultivées en 3D. De plus, nos résultats ont également permis de montrer que cette isoforme est nécessaire pour l'organisation des points focaux d'adhésion et l'assemblage de la membrane basale (Peng et al., 2015).

### **7.2.2. Régulation des septines par les phosphoinositides**

Les septines se lient aux membranes en interagissant avec les PIs par leur domaine polybasique (PB) (Casamayor and Snyder, 2003), (Zhang et al., 1999).

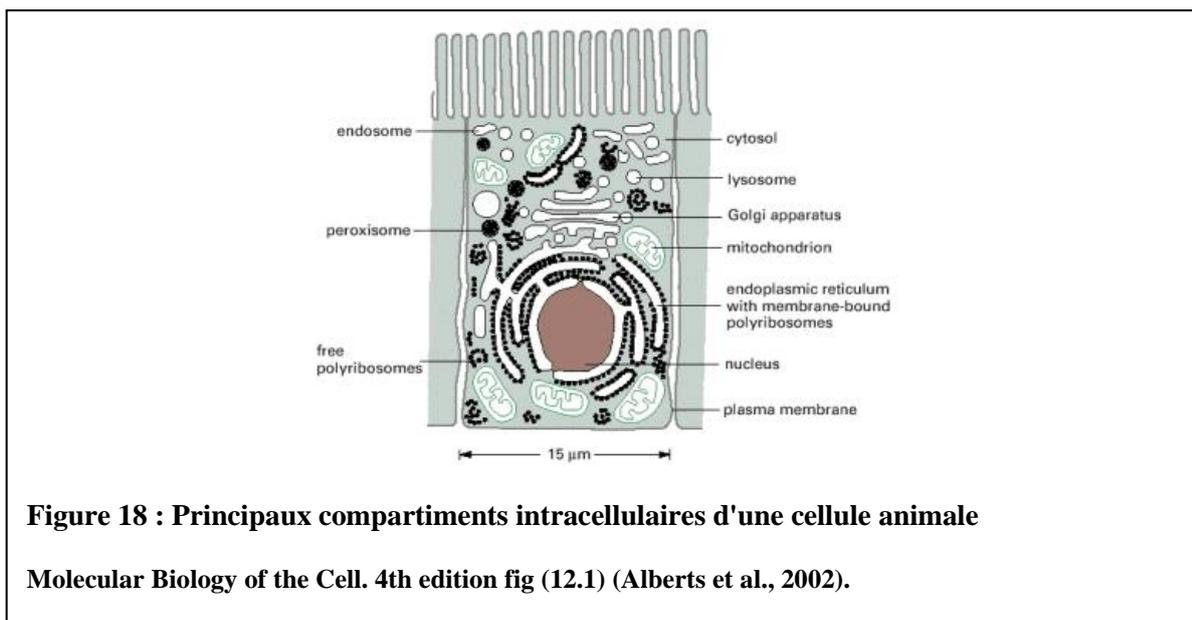
Zhang et ses collègues ont montré qu'un traitement permettant de séquestrer, de déphosphoryler ou de dégrader le PtdIns 2P altère l'apparence et la localisation des filaments de septine 4 (Zhang et al., 1999). De plus, des hétéro-octamères de septines de levure purifiés se polymérisent en filaments sur des monocouches lipidiques contenant de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns4,5P2) (Bertin et al., 2010). Ces filaments de septines ressemblent aux structures filamenteuses observées *in situ* (Bertin et al., 2012), ce qui suggère un rôle régulateur des PIs pour la formation des filaments des septines. Une autre approche a aussi montré que l'interaction septines-PIs était importante pour l'assemblage des filaments des septines. En effet, la mutation des résidus du PB provoque un mauvais assemblage des septines à la base des bourgeons et des défauts de cytokinèse chez la levure (Casamayor and Snyder, 2003). De plus, une étude utilisant des liposomes contenant PtdInsP et PtdIns 2P et des septines de mammifères purifiées a montré que ces septines sont impliquées dans les changements de formes des membranes et qu'il existe une interdépendance entre la polymérisation des filaments de septines et la forme des membranes. Ceci suggère que les PIs régulent la polymérisation des filaments de septines, et que les filaments de septines à leur tour contrôlent la forme de la membrane qui les contient (Tanaka-Takiguchi et al., 2009).

### 7.3. Le trafic intracellulaire :

Les procaryotes et les eucaryotes constituent les deux empires de monde d'êtres vivant sur notre planète (Mayr, 1998). Contrairement aux procaryotes comme les bactéries, qui se composent généralement d'un seul compartiment intracellulaire entouré d'une membrane plasmique (PM), les cellules eucaryotes sont subdivisées en compartiments par des membranes fermées et fonctionnellement distinctes. Chaque compartiment, ou organe, contient son propre groupe caractéristique d'enzymes et d'autres molécules spécialisées. Ces compartiments sont reliés par des systèmes de distribution qui permettent le transport des molécules d'un compartiment à l'autre. Pour comprendre la cellule eucaryote il est essentiel de savoir ce qui se passe dans chacun de ces compartiments, comment les molécules se déplacent, et comment les compartiments sont créés et maintenus.

#### 7.3.1. Les organites membranaires des cellules eucaryotes

Le système des membranes intracellulaires chez les eucaryotes crée des compartiments fermés qui sont séparés du cytosol, définissant ainsi dans la cellule des espaces fonctionnellement spécialisés. La membrane de chaque organe doit contenir des protéines de transport membranaires qui sont responsables de l'importation et l'exportation des molécules spécifiques. Les principaux compartiments intracellulaires communs aux cellules eucaryotes, le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries, les endosomes, les lysosomes et les peroxysomes sont illustrés sur la figure 18.



### **7.3.2. Les différents types de transport dans la cellule eucaryote.**

La majorité des protéines sont synthétisées par les ribosomes dans le cytosol, quelques-unes sont synthétisées sur les ribosomes des mitochondries. Leur destin ultérieur dépend de leur séquence en acides aminés, qui peut contenir des signaux qui dirigent leur sécrétion à l'extérieur de la cellule ou vers un organe donné dans la cellule. La plupart des protéines ne possédant pas le signal de sécrétion restent par conséquent dans le cytosol comme des résidents permanents. Cependant, d'autres protéines possèdent des signaux de tri spécifiques qui dirigent leur transport vers le noyau, le RE, les mitochondries, ou peroxysomes. Pour comprendre les principes généraux qui opèrent les signaux de tri, il est important de distinguer trois voies de transport fondamentalement différentes par lesquelles les protéines se déplacent d'un compartiment à l'autre. Ces trois systèmes de transport sont décrits ci-dessous, et leurs sites d'action dans la cellule sont décrits dans la figure 18.

#### ➤ **Le transport des protéines via les pores nucléaires (*gated transport*)**

Le trafic de protéines entre le cytosol et le noyau se produit à travers les complexes de pores nucléaires. Ces complexes fonctionnent comme des portes sélectives qui transportent activement des macromolécules et des assemblages macromoléculaires spécifiques, mais ils permettent également la diffusion libre de molécules plus petites.

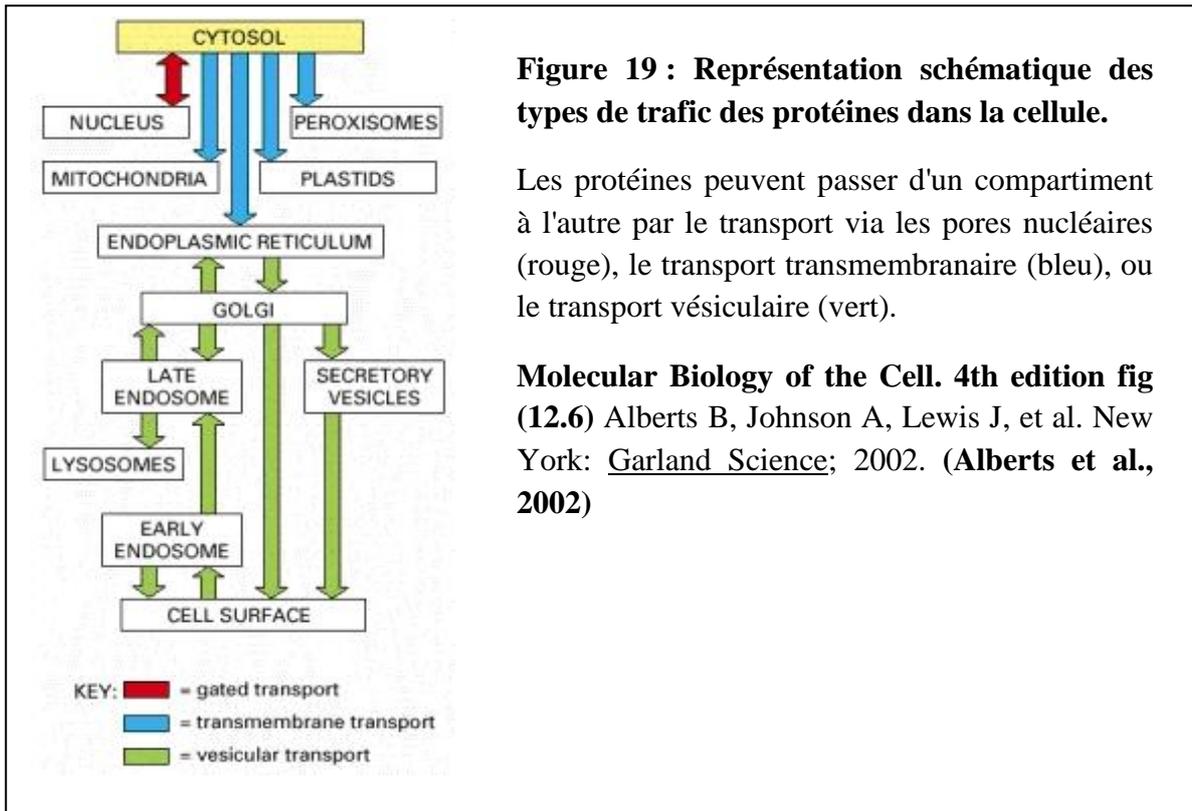
#### ➤ **le transport transmembranaire**

Dans ce type de transport les transporteurs des protéines liées à la membrane (*membrane-bound protein translocators*) acheminent directement des protéines spécifiques à travers une membrane à partir du cytosol pour arriver à une espace cible distinct. La protéine transportée doit généralement se dérouler pour serpenter à travers le transporteur. Le transport initial des protéines du cytosol à la lumière du réticulum endoplasmique ou du cytosol aux mitochondries, par exemple, se produit de cette façon.

#### ➤ **Le transport vésiculaire**

Dans ce type de transport des vésicules sphériques ou de forme irrégulière transfèrent les protéines d'un compartiment à un autre. Ces vésicules se forment à partir du bourgeonnement de la membrane des différents organelles entraînant un cargo de molécules présentes dans la lumière de ces organelles. Ils déchargent leur cargo dans le compartiment cible par la fusion avec sa membrane. Par exemple, le transfert des protéines solubles du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi se produit de cette façon. Les signaux qui

dirigent le mouvement d'une protéine donnée et déterminent sa destination finale dans la cellule, sont contenus dans la séquence en acides aminés de la protéine. Le voyage commence par la synthèse d'une protéine sur un ribosome dans le cytosol et se termine lorsque la destination finale est atteinte. A chaque station intermédiaire (boîtes), une décision est prise pour savoir si la protéine est conservée en ce compartiment ou transportée plus loin. En principe, un signal pourrait être nécessaire soit pour la rétention ou la sortie d'un compartiment (figure 19).



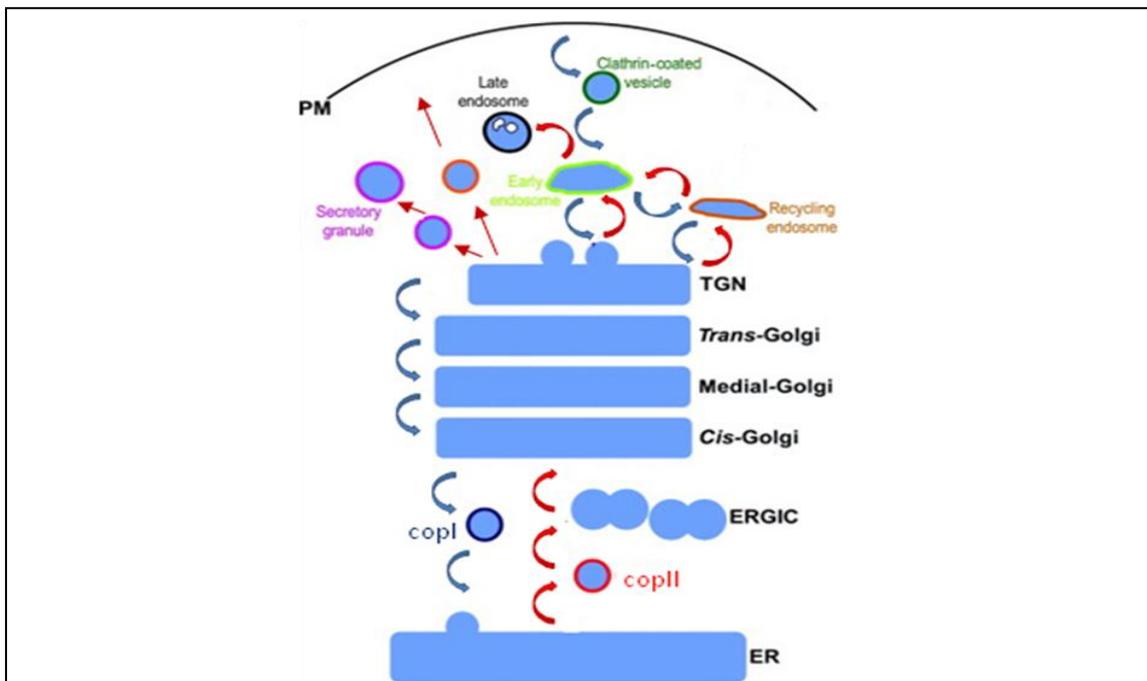
### 7.3.3. Les compartiments intracellulaires, le transport vésiculaire et les modèles de trafic cellulaire

De façon générale, les voies du trafic intracellulaire ont été traditionnellement divisées dans la voie de l'exocytose et la voie d'endocytose. Les deux voies sont constituées d'un réseau de compartiments membranaires dont les fonctions principales sont de modifier les protéines nouvellement synthétisées et de les livrer à leur emplacement approprié dans la cellule ou à l'extérieur par la sécrétion (exocytose) et de réguler l'absorption et le renouvellement des protéines de surface cellulaire (endocytose). Les composants des voies de

l'exocytose et d'endocytose comprennent le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les endosomes, les lysosomes et la membrane plasmique.

**EXOCYTOSE** : Les cargos antérograde se déplacent à travers Golgi et sont triés sur le réseau trans-Golgien (TGN). Différents types des vésicules et des transporteurs tubulo-vésiculaire transportent alors les cargos vers diverses destinations.

**ENDOCYTOSE** : Les protéines entrent dans la cellule au niveau de la membrane plasmique par endocytose. Elles sont transportées au début dans les endosomes précoces et ensuite les protéines peuvent être transportées à partir des endosomes précoces vers le lysosome via l'endosome tardif ou conduit au TGN, ou encore recyclé vers la membrane plasmique (Derby and Gleeson, 2007) (figure 20).



**Figure 20 : Les voies d'exocytose et d'endocytose**

Les voies d'exocytose (flèches rouges) et le voie d'endocytose (flèches blues)(Derby and Gleeson, 2007).

➤ **Le réticulum endoplasmique**

Le RE est le plus grand compartiment intracellulaire et est généralement composé d'un vaste réseau interconnecté de tubules membranaires et citernes que l'on trouve dans toute la cellule (Palade and Porter, 1954).

Etant le premier organite dans la voie de l'exocytose, le RE représente un compartiment clé pour le contrôle de la qualité des protéines synthétisées. Dans cet organite les protéines seront criblées pour s'assurer que leur repliement est correct avant d'être sécrétées ou transportées vers d'autres organelles par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi. Certaines protéines sont capables de se replier dans leurs structures natives rapidement, au cours de la translocation dans le RE, tandis que d'autres nécessitent des protéines chaperonnes (Kleizen and Braakman, 2004). Les protéines mal repliées sont retenues dans le RE par leur interaction avec les chaperonnes comme les BiP. Elles sont alors dirigées par le complexe Sec61 vers le protéasome 26S cytosolique pour la dégradation. Ce processus est connu comme la dégradation associée au RE (*ER-associated degradation* ERAD) (Wiertz et al., 1996).

Lorsque le repliement et la modification post-traductionnelle sont corrects, les protéines nouvellement synthétisées seront séparées des protéines résidentes du RE pour être transportées vers l'appareil de Golgi. Cela se produit sur les sites de sortie du RE, qui ne contiennent pas de ribosomes et sont associés aux bourgeons qui produiront des vésicules sortantes (Hammond and Glick, 2000).

Les protéines seront ensuite chargées de manière sélective dans les vésicules en interagissant avec des composants du complexe des protéines d'enveloppe COPII, soit directement (dans le cas de protéines transmembranaires) soit indirectement (cas des protéines solubles) par les « *transmembrane cargo receptors* » tels que la lectine ERGIC53 (Schrag et al., 2003) et les protéines de la famille P24 (Kaiser, 2000)(Murshid and Presley, 2004).

#### ➤ **Le compartiment intermédiaire du RE-Golgi (ERGIC)**

Le modèle largement accepté concernant le transport RE-Golgi implique le bourgeonnement des vésicules COPII du RE, qui ensuite fusionnent pour former des clusters tubulaires pré-Golgiens (*pre-Golgi tubular clusters*), appelées clusters vésiculaires-tubulaires (*vesiculartubular clusters* VTCs), qui feront partie du réseau cis Golgi, (Bannykh et al., 1998). Les VTCs seront transportés sur les microtubules et les protéines résidentes dans le RE seront recyclées dans ce compartiment par le transport rétrograde des vésicules COPI (Barlowe, 2000). Donc, l'ERGIC est une station transitoire entre le RE et le cis-Golgi. L'ERGIC représente également un autre point de qualité des protéines: les protéines mal repliées (liés à des chaperonnes) peuvent être récupérées dans le RE pour une autre tentative de pliage, ou ERAD.

## ➤ L'appareil Golgi

L'appareil de Golgi est constitué d'une série de citernes membranaires de forme discoïdale, typiquement organisés en empilements étroitement alignés. Le nombre de citernes à l'intérieur de l'empilement de Golgi varie normalement de trois à huit (Polishchuk and Mironov, 2004). Dans les cellules des mammifères, plusieurs citernes de Golgi sont reliées entre elles, ce qui forme une structure de ruban réticulaire qui est activement maintenu autour les centrosomes par des interactions avec les microtubules (Rios and Bornens, 2003). Les côtés cis et trans de ces citernes qui représentent les points d'entrée et de sortie des cargos sont associés aux ERGIC et au TGN (Martínez-Alonso et al., 2013) (figure 21).

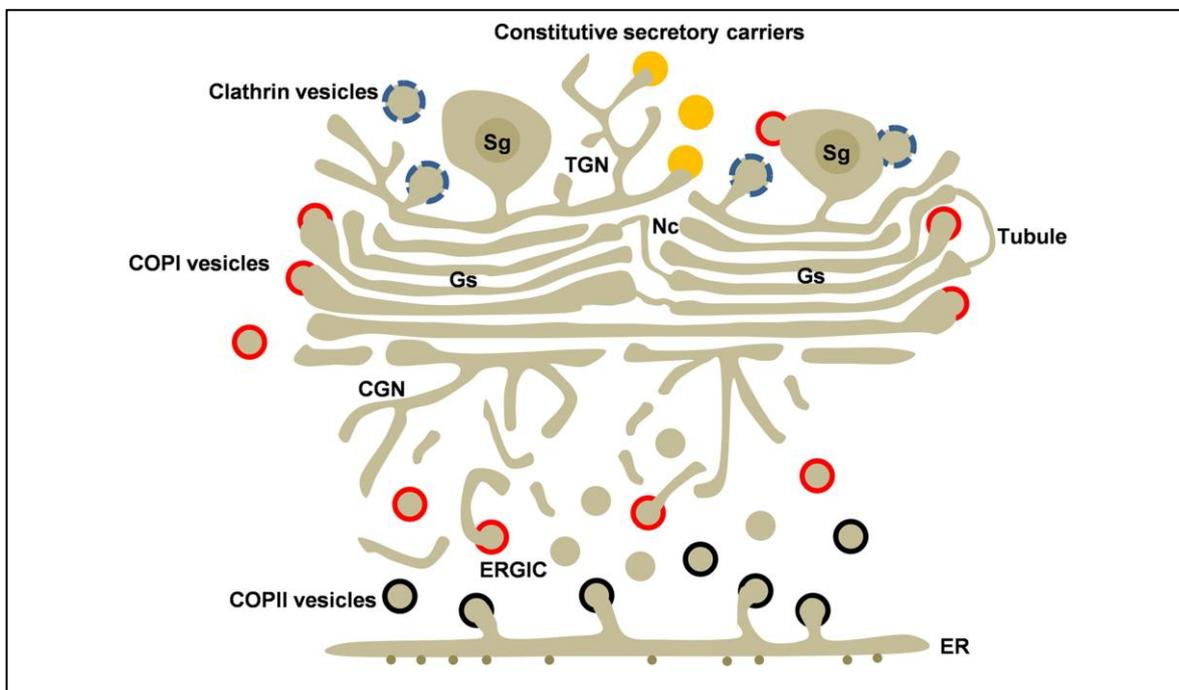


Figure 21: Schéma de l'appareil de Golgi et organisation des intermédiaires de transport de la voie de sécrétion. ER : réticulum endoplasmique ; ERGIC : compartiment intermédiaire entre le ER et le Golgi ; CGN : *cis-Golgi network* ; Gs : saccules du Golgi ; Nc : régions non compactes du Golgi ; TGN : *trans-Golgi network* ; Sg : vésicule de sécrétion.(Martinez-Alonso et al., 2013).

## ➤ Le réseau trans-Golgien (TGN)

Le TGN est un compartiment réticulaire situé à la face externe de l'empilement de l'appareil Golgi qui produit des vésicules recouvertes de clathrine et les transporteurs sécrétoires (De Matteis and Luini, 2008)(Griffiths and Simons, 1986).

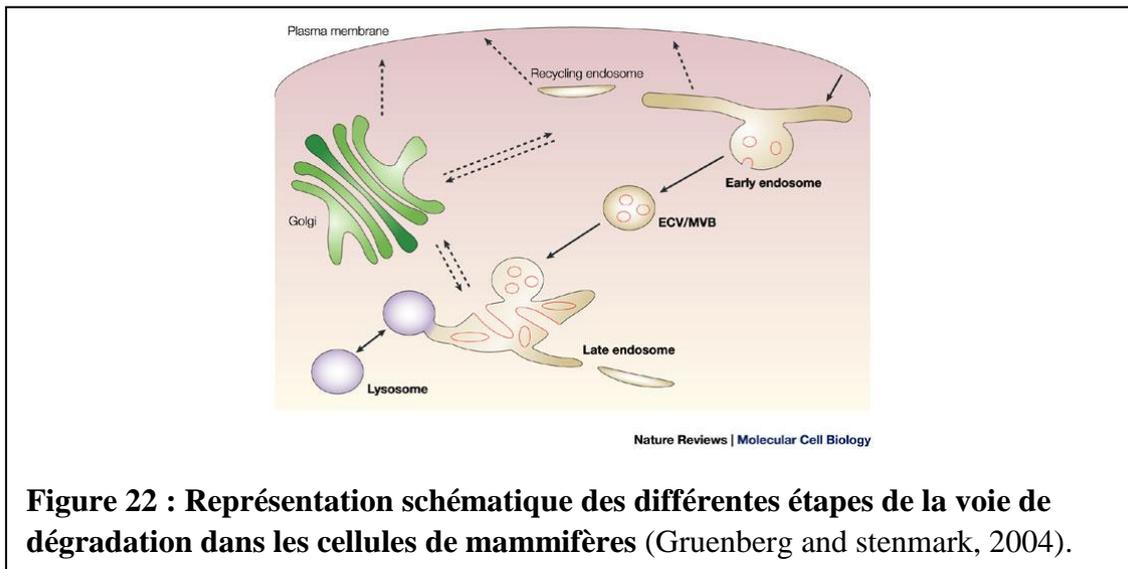
Au TGN, les cargos des différentes protéines et des lipides sont triés et emballés dans des porteurs membranaires. Ils sont transmis aux différents organites de la cellule comme la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes (via les endosomes tardifs), les granules de sécrétion. Ils peuvent aussi revenir vers les citernes de Golgi (Keller and Simons, 1997)(Opat et al., 2001)(Derby and Gleeson, 2007) et peut-être directement vers le RE (Young et al., 2005). Le TGN est également au centre de la voie de recyclage des protéines endosomales et des protéines de la membrane plasmique (Shewan et al., 2003)(Medigeshi and Schu, 2003).

La voie d'endocytose est constituée de nombreux organites vésiculaires, y compris les endosomes précoces, les endosomes de recyclage, les MVB (*multivesicular bodies*), les endosomes tardifs et les lysosomes. Les systèmes endosomal et lysosomal exercent différentes fonctions, y compris l'absorption des molécules et des ligands extracellulaires, l'internalisation des protéines et des lipides, la régulation des voies de signalisation cellulaire, le recyclage des protéines vers l'appareil de Golgi, le TGN ou la membrane plasmique et la dégradation des protéines impliquées dans les voies d'endocytose et d'exocytose (Derby and Gleeson, 2007).

#### ➤ **Les endosomes, MVB, les lysosomes**

Dans les cellules de mammifères, les molécules internalisées par endocytose se déplacent généralement dans les endosomes précoces, qui mûrent pour donner les endosomes tardifs et les lysosomes (Dunn et al., 1989). Comme le TGN, les endosomes représentent un compartiment de tri important. Le tri et le recyclage se produisent dans les endosomes précoces, à partir desquels les protéines peuvent revenir à la membrane plasmique soit rapidement soit plus lentement par les endosomes de recyclage (Maxfield and McGraw, 2004). Les protéines ciblées pour la dégradation par la voie d'ubiquitination seront internalisées dans les endosomes tardifs pour former les MVBs, chemin de dégradation dans les lysosomes (Figure 22) (Gruenberg and Stenmark, 2004). Une autre alternative des MVBs existe: dans certains cas, les MVBs peuvent fusionner avec la membrane plasmique pour adresser les vésicules intraluminales dans l'espace extracellulaire. Ces vésicules sécrétées, appelées exosomes, sont impliquées dans la communication intercellulaire qui pourrait être importante dans la régulation des réponses immunitaires et pourrait également être exploitée par des agents pathogènes viraux (Février and Raposo, 2004). Il existe au moins deux voies de transport rétrogrades distinctes entre le TGN et les endosomes. L'une des voies implique le transport des endosomes précoces et des endosomes de recyclage vers le TGN. C'est par

exemple le cas dans la voie de transport rétrograde de la toxine bactérienne Shiga (Les toxines Shiga sont une famille de toxines, nommés pour Kiyoshi Shiga, qui a décrit l'origine bactérienne de la dysenterie provoquée par *Shigella dysenteriae*.) ces toxines sont transportées à partir de la membrane plasmique vers l'appareil de Golgi et ER (Johannes and Goud, 1998). La deuxième voie majeure de transport rétrograde des endosomes vers TGN intervient via les endosomes tardifs. Par exemple, la furine fait la navette entre les endosomes tardifs et le TGN (Mallet and Maxfield, 1999).



### 7.3.4. Le transport à travers l'appareil Golgi

L'appareil de Golgi est un organe hautement dynamique, contenant des milliers de protéines, y compris des protéines nouvellement synthétisées en transit, ainsi que des protéines résidentes. Les protéines résidentes comprennent de nombreuses classes d'enzymes qui, ensemble fonctionnent comme une " ligne de production " pour modifier les protéines et les lipides pendant leur passage du côté cis au côté trans du Golgi pour leur adressage vers la voie d'exocytose (Altan-Bonnet et al., 2004). Les petites GTPases comme les protéines Rabs sont associées aux membranes de l'appareil Golgi et jouent un rôle clé dans le processus de transport (Goud et al., 1990).

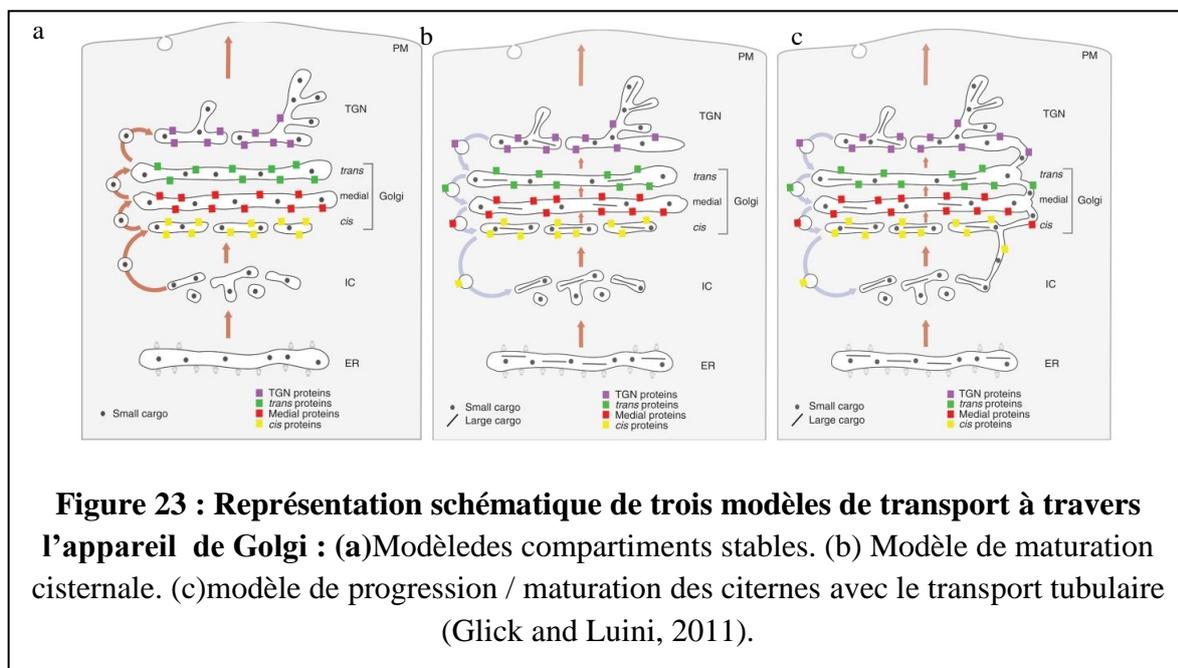
Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment les protéines sont transportées à travers l'appareil de Golgi :

**Le modèle des compartiments stables :** Selon ce modèle, les citernes cis-, median-, et trans-Golgi ainsi que le réseau trans-Golgien (TGN) sont des entités stables qui conservent toujours des protéines spécifiques. Les cargos sécrétés voyagent d'un compartiment de Golgi

à l'autre dans des vésicules COPI de transport antérograde, puis quittent le TGN dans des vésicules de clathrine (CCV) ou des transporteurs sécrétoires (Rothman and Wieland, 1996). Le transport ER-Golgi est considéré comme une voie donneur-accepteur reliée par des vésicules COPII (Figure 23).

**Le modèle progression / maturation des citernes :** Selon ce modèle, les citernes de l'appareil de Golgi sont des structures transitoires qui se forment de novo par la fusion des vésicules COPII. Une nouvelle citerne est maturée à partir de cis et trans, puis se décompose au niveau de TGN. Les cargos sont transportés à travers l'appareil de Golgi par la progression des citernes. Le maintien des protéines résidentes de Golgi est entraînée par le transport rétrograde des vésicules COPI au sein de l'appareil de Golgi, et peut également impliquer le recyclage de clathrine d'un compartiment maturé au TGN (Glick and Malhotra, 1998)(Pelham, 1998)(Glick and Nakano, 2009) (Figure 23).

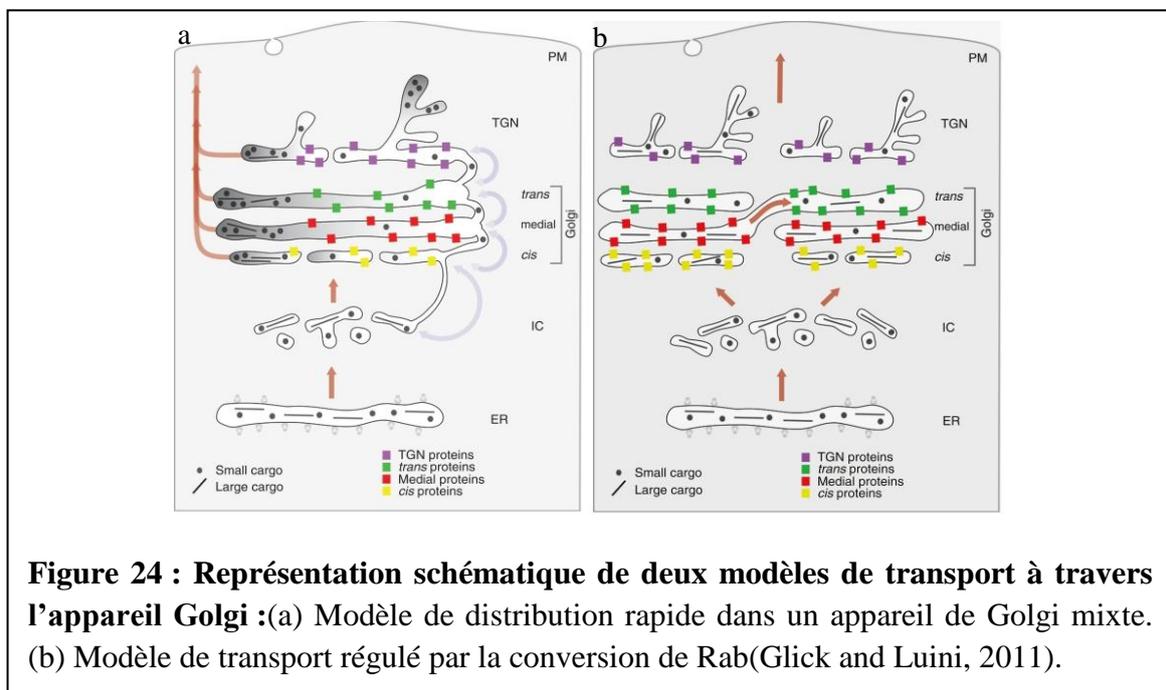
- ❖ **Le modèle de progression / maturation des citernes avec le transport tubulaire hétérotypique.** Ce modèle est identique au modèle de progression / maturation des citernes, à l'exception que dans un empilement, les citernes sont reliées par des continuités tubulaires à travers lesquelles de petits chargements sécrétoires et les protéines résidentes de Golgi peuvent diffuser (Figure 23).



- ❖ **Le modèle de distribution rapide dans un appareil de Golgi mixte.** Selon ce modèle, l'appareil de Golgi fonctionne comme un seul compartiment qui contient des domaines de

traitement et des domaines d'exportation. Les cargos sécrétés arrivent du RE, ils sont distribués entre les deux domaines de l'appareil de Golgi, puis sortent d'une manière stochastique de chaque niveau de l'appareil de Golgi vers leurs destinations finales (Patterson et al., 2008) (Figure 24).

- ❖ **Le modèle de transport régulé par la conversion de Rab:** Dans ce modèle, l'appareil de Golgi est décrit comme un compartiment stable qui est divisé en domaines définis par les Rab GTPases (Pfeffer, 2010). Cette idée se fonde sur des études indiquant que dans les endosomes, les protéines Rab peuvent établir des domaines distincts dans une membrane (Sönnichsen et al., 2000) et peuvent conduire à une transformation biochimique d'un compartiment par un processus connu sous le nom de conversion de Rab (Rink et al., 2005). Par analogie, un domaine dans une citerne de Golgi pourrait subir une conversion de Rab suivie par une fusion antérograde avec un domaine correspondant de Rab dans une citerne adjacente. De cette façon, les cargos sécrétaires pourraient avancer à travers le Golgi grâce à un transfert entre les empilements adjacents. Alternativement, un domaine de Rab pourrait créer une "megavesicule," qui serait ensuite fusionnée avec la citerne la plus proche du même empilement de Golgi (Pfeffer, 2010) (Figure 24).



### 7.3.5. Le rôle des petites protéines G dans le trafic intracellulaire

Les petites protéines liant le GTP (protéines G) sont des protéines monomériques avec des masses moléculaires allant de 20 à 40 kDa. Elles sont classées en au moins cinq familles: Ras, Rho, Rab, Sar1 / ARF, et Ran. Les membres des familles Rab et Sar1/ARF régulent le trafic intracellulaire et sont associés à un certain nombre d'organites d'endocytose.

Le cycle entre la forme cytosolique liant le GDP (inactif) et la forme associée à la membrane liant le GTP (actif) de ces petites protéines G fournit un mécanisme majeur de régulation du remodelage des domaines membranaires fonctionnels dans les voies d'endocytose et l'exocytose. L'activation et l'inactivation de ces protéines sont régulées par trois types de régulateurs :

- *Guanine nucleotide- exchange factors* (GEFs).
- *GTPase activating proteins* (GAPs).
- *GDP dissociation inhibitors* (GDIs, que pour les membres de la famille Rab).

Les familles Rab et Arf sont toutes les deux impliquées dans le contrôle du trafic vésiculaire. Schématiquement, les membres de la famille Arf contrôlent les étapes précoces (bourgeonnement et fission) de la formation des vésicules. Inversement, les étapes tardives (déplacement, adressage, fusion) sont contrôlées par les membres de la famille Rab. Les Arf de classe I et II sont localisées sur les membranes de la voie sécrétoire précoce (ERGIC et cis-Golgi) ainsi que sur le trans-Golgi et le TGN (Duijsings et al., 2009)(Duijsings et al., 2009)(Manolea et al., 2010). Une fois activée par une GEF de la famille Sec7, Arf1 recrute de nombreux effecteurs comme les manteaux *coatome protein I* (COPI), les adaptateurs AP1,3,4: (*adaptor protein 1,2,3*) (Deng et al., 2009)(Austin et al., 2002), des protéines de reconnaissance des lipides (FAPP1,2: *four-phosphate-adaptor protein*) (De Matteis and Godi, 2004), des enzymes de modification des lipides (PI4K : *PtIns-4 kinase*, PLD: *phospholipase D*) (Shin and Nakayama, 2004)(Kim et al., 1998), des enzymes de transfert de lipide (CERT: *ceramide transfer protein*) (De Matteis and Godi, 2004) ou le facteur d'attachement GMAP210 (*Golgi-associated microtubule binding protein 210*) (Cardenas et al., 2009). Les effecteurs des Rab sont principalement impliqués dans le déplacement des vésicules (moteurs moléculaires), dans l'adressage des vésicules (facteurs d'attachement) et dans la fusion avec le compartiment accepteur. Rab6 est localisée au niveau du TGN et du trans-Golgi et est impliquée dans le transport rétrograde des endosomes vers le Golgi et du Golgi vers le RE (trafic rétrograde indépendant de COPI) (Echard et al., 2001). Rab6 possède deux isoformes (Rab6A et Rab6A') résultant d'un épissage alternatif d'un exon dupliqué. Ces deux isoformes semblent avoir des fonctions chevauchantes mais non entièrement redondantes (Del Nery et

al., 2006). Rab6 intervient dans le recrutement de plusieurs moteurs sur le Golgi dont la dynéine (Short et al., 2002), Rab kinesine-6 (Echard et al., 2001)(Echard et al., 1998) et la myosine (Miserey-Lenkei et al., 2010). Il existe deux catégories de facteurs d'attachement (*tether*) permettant l'adressage des vésicules : les longs coiled-coil (p115, GM130) et les complexes multiprotéiques (TRAPPI, TRAPPII : transport protein particle I, II). Par exemple, l'interaction entre p115 et GM130 permet de cibler les vésicules issues du RE vers le Golgi (Alvarez et al., 1999). Ces deux facteurs sont recrutés par la petite protéine G Rab1 (Allan et al., 2000)(Weide et al., 2001) qui existe sous deux isoformes (Rab1A et Rab1B). Rab1 contrôle le trafic antérograde entre le RE et le Golgi (García et al., 2011). Enfin, la fusion de la vésicule avec la membrane du compartiment accepteur est réalisée par les SNARE. La régulation des SNARE par les Rab repose souvent sur une interaction indirecte entre la Rab et les SNARE (Epp et al., 2011). L'une des questions non résolues en biologie est comment les vésicules sont adressées vers le bon compartiment, et comment le flux doit être correctement dirigé (rétrograde ou antérograde). L'une des réponses est basée sur les cascades entre les protéines G. En fait, plusieurs cascades ont été documentées dans les cellules de mammifères ou la levure, permettant d'expliquer en partie la directionnalité du flux membranaire (Figure 25). Par exemple, au sein du Golgi, il existe une cascade entre Rab6 et Rab33. La déplétion de Rab6 a le même effet que la déplétion de Rab33, suggérant une action dans la même voie de trafic (Starr et al., 2010). En effet, il a ensuite été montré que la Rab33, localisée sur le Golgi-médian, recrutait le complexe Ric1-Rgp1 qui est un facteur d'échange de Rab6 (Pusapati et al., 2012)(Mizuno-Yamasaki et al., 2012).

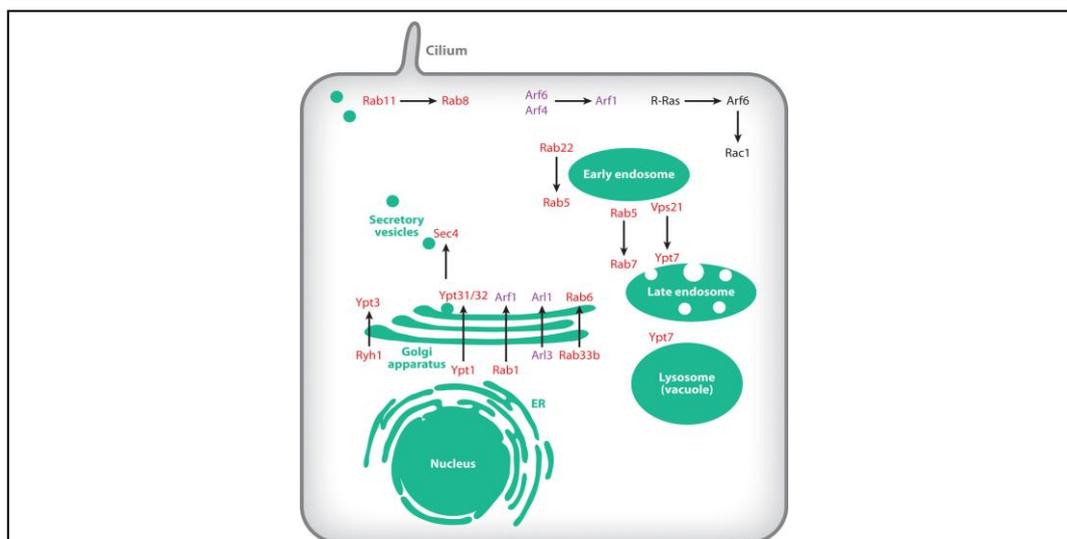


Figure 25 : Localisation des cascades de protéines G dans une cellule épithéliale. (Mizunà-Yamasaki et al.,2012)

## **7.4. La régulation de la morphologie de l'appareil Golgi**

L'appareil de Golgi est un organite hautement dynamique, capable de se disperser rapidement et de se réassembler sous différentes conditions physiologiques, comme au cours du cycle cellulaire. Ces événements peuvent avoir lieu également sous des conditions expérimentales, par exemple le traitement par le nocodazole disperse l'appareil de Golgi et le lavage du nocodazole permet son réassemblage.

### **7.4.1. L'appareil Golgi pendant le cycle cellulaire**

Pendant la division cellulaire les membranes de l'appareil de Golgi se fragmente en petites vésicules qui se répartissent entre les deux cellules filles comme c'est le cas pour les autres organelles et l'ADN. Cette ségrégation du Golgi se produit à travers plusieurs étapes hautement régulées et réversibles. Ce processus commence en phase G2 du cycle cellulaire, lorsque le Golgi se dissocie en plusieurs saccules empilés. cette étape contrôle la transition G2 / M (Colanzi et al., 2007)(Feinstein and Linstedt, 2007) et c'est un résultat de la phosphorylation des protéine GRASPs et GM130 par les kinases mitotiques, ce qui perturbe leur oligomérisation et permet la dissociation des empilements (Wang et al., 2005), (Xiang and Wang, 2010). Ensuite, pendant la métaphase, Les étapes successives de fragmentation conduisant à la formation de "*Golgi haze*", nécessite l'activité des kinases Plk1 (*Polo-like kinase 1*) et Cdc2 et leurs cibles GRASP55 et GRASP65 (Xiang and Wang, 2010). D'ailleurs, il faut noter que toutes les membranes de Golgi ne sont pas transformées en vésicules lors de la mitose. Certaines restent comme des structures tubulo-vésiculaires. Ces membranes de Golgi contiennent des protéines de matrice, y compris les GRASPs et golgins et peuvent servir à la fin de la mitose comme des éléments de base pour la formation d'un nouvel appareil Golgi dans les cellules filles (Seemann et al., 2002).

Au cours de la mitose, les microtubules sont organisés en fuseau mitotique et l'appareil de Golgi se désassemble. Les vésicules dérivées de la fragmentation du Golgi se dissocient du fuseau, tandis que, quelques fragments de Golgi restent associés au fuseau, et subissent une répartition ordonnée entre les cellules filles et peuvent servir comme des éléments de départ dans le réassemblage du Golgi (Shima et al., 1998) (figure 26).

Pendant la telophase, les miniciternes de Golgi sont formées par la fusion membranaire et regroupées d'une manière indépendante des microtubules. Ce processus commence par la fusion post-mitotique des membranes du Golgi qui nécessite des protéines

d'attache (*tethering*) telles que la P115, Giantin et GM130, SNAP, SNARE, ATPases AAA, NSF, *valosin-containing protein p97* (VCP) (Meyer, 2005).

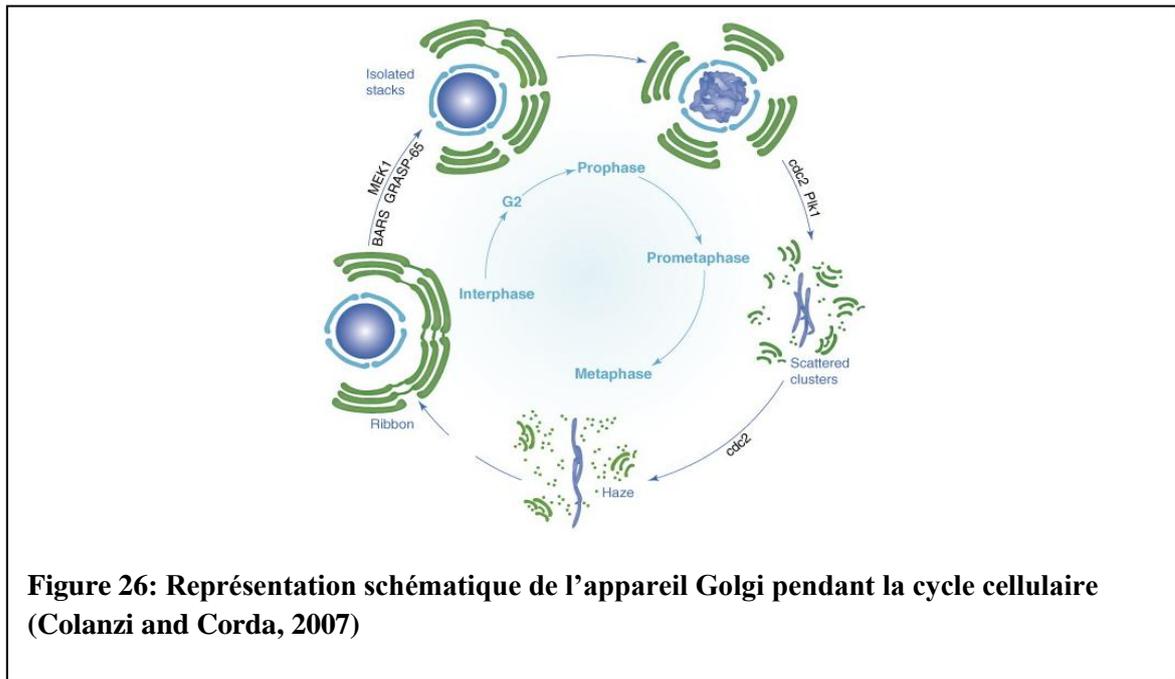
Par la suite, les microtubules générés à partir des miniciterne de Golgi et de centrosomes sont impliqués dans le déplacement des miniciterne l'une vers l'autre et vers le centre de la cellule pour réassembler Golgi en deux étapes (Miller et al., 2009).

Tout d'abord, les miniciterne Golgiennes subissent un regroupement initial à la périphérie de la cellule, qui est désigné comme le stade Golgien. A ce stade, les miniciterne restent loin des centrosomes, cependant des microtubules qui poussent à partir d'eux servent à relier l'un avec l'autre pour faciliter leur rapprochement. Au cours de ce stade, les particules de Golgi seront doublées en taille et leur nombre total diminué et forment des empilements. La déplétion de la protéine CLASP (*CLIP-associated proteins*) abolit la formation des microtubules dérivés de Golgi et le regroupement initial des miniciterne Golgiennes.

Dans la deuxième étape, les empilements de Golgi se déplacent vers le centre de la cellule sur les microtubules dérivés des centrosomes pour compléter le réassemblage du Golgi en ruban. Cette étape est appelée le stade centrosomal. En cas de l'inhibition des microtubules dérivés de Golgi par la déplétion de CLASP, les miniciterne de Golgi peuvent encore être déplacés vers le centre de la cellule par les microtubules dérivées des centrosome, mais le Golgi reste plus fragmentés (Miller et al., 2009).

D'un autre part, lorsque les microtubules dérivés des centrosomes sont perturbées par l'ablation des centrosomes par le laser, une grande partie des empilements de Golgi peut encore se déplacer l'un vers l'autre et, enfin, arriver au centre de la cellule. Cependant, Certains petits fragments restent libres et bloquer par le noyau à l'absence des microtubules centrosomales. Fait intéressant, une fois que le Golgi est présent au centre de la cellule, les microtubules dérivés de Golgi sont suffisantes pour soutenir l'intégrité de Golgi et les centrosomes devient dispensable (Vinogradova et al., 2012). Les deux étapes de l'assemblage Golgi nécessitent la fonction de la dynéine (Vinogradova et al., 2012)(Miller et al., 2009).

Le rôle la dynéine dans l'assemblage du Golgi a été remis en évidence par une découverte récente qui a montré que la protéine localisant le cis-Golgi, la golgine-160 recrute la dyneine au Golgi par une interaction directe. La déplétion de la golgine-160 abolit le trafic du RE vers le Golgi et cause ainsi la fragmentation du Golgi, et cet effet est semblable à celui causé par le traitement avec le nocodazole. La Golgine-160 est recrutée sur le cis-Golgi par son interaction avec Arf1 GTPase. Cependant son septième domaine organisé en superhélice, CC7, se lie à la dynéine (Yadav et al., 2012).



#### 7.4.2. La régulation de la morphologie de l'appareil Golgi pendant l'interphase :

La structure caractéristique de l'appareil de Golgi pendant l'interphase chez les mammifères dépend de nombreux mécanismes moléculaires. Par exemple l'arrangement fonctionnel en trois dimensions des membranes du Golgi est assuré par les protéines de matrice du Golgi comme la GM130 (*Golgi matrix protein*), les golgines et les protéines GRASP (*Golgi reassembly stacking proteins*) (Puthenveedu et al., 2006) (Feinstein and Linstedt, 2008).

Cependant, la régulation de la morphologie du Golgi implique l'actine et les microtubules, ainsi que les protéines *motrices* associées aux microtubules et l'apport des membranes transportées à partir du RE (Marra et al., 2007)(Valente and Colanzi, 2015).

Le positionnement de l'appareil de Golgi dans la région périnucléaire près du centrosome est effectué par un mécanisme dépendant des microtubules (Rambourg and Clermont, 1990).

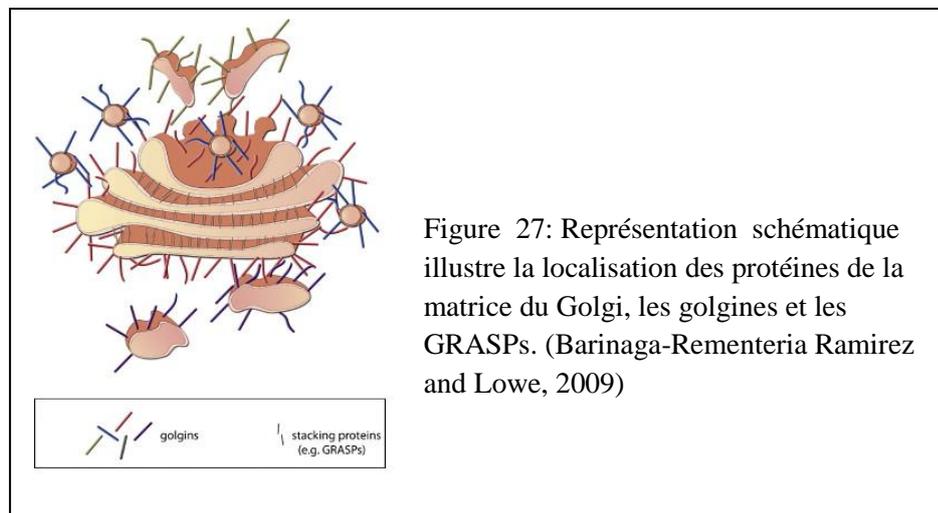
##### ➤ Rôle des protéines de la matrice Golgienne

Plusieurs études morphologiques et biochimiques depuis les années 60 et 70 ont identifié des connexions entre les citernes du Golgi (Turner and Whaley, 1965)(Franke et al., 1972). Après en 1994, Warren et ses collègues ont isolé un complexe protéique qui forme une structure protéique (appelé matrice) à laquelle les enzymes de Golgi pourraient s'attacher. Par

cette étude innovante ils ont introduit la notion des protéines de la matrice du Golgi (Slusarewicz et al., 1994).

Le premier composant identifié parmi ces protéines est la GM130 (Nakamura et al., 1995) une protéine en forme d'une tige localisé au cis-Golgi (Alvarez et al., 2001).

Actuellement, de nombreuses protéines de la matrice du Golgi ont été découvertes, y compris les protéines GRASPs et les golgines, qui sont impliquées dans le maintien et l'organisation de la structure du Golgi. En fait, la déplétion d'une protéine de la matrice du Golgi comme la GRASP65 (Veenendaal et al., 2014), GRASP55 (Feinstein and Linstedt, 2008), GM130 (Puthenveedu et al., 2006), golgin-84, and golgin-160 (Williams et al., 2006) aboutit à une fragmentation anormale de l'appareil Golgi. Les protéines de matrice sont également impliquées dans la régulation du trafic des protéines à travers les citernes du Golgi (Xiang and Wang, 2011) (figure 27).



### ➤ Rôle des microtubules dans la régulation du Golgi pendant l'interphase:

La formation de la structure caractéristique du Golgi dépend des protéines de la matrice golgienne et des microtubules. Les microtubules dérivés des centrosomes sont connus pour amener l'empilement de saccules du Golgi vers la région pericentrosomal par les protéines motrices dirigée par des microtubules. Des études récentes ont révélé que l'appareil de Golgi peut être également un centre d'organisation des microtubules par le recrutement de la  $\gamma$ -tubuline ce qui permet la nucléation des microtubules. En fait, ces microtubules servent à maintenir les citernes l'une à proximité de l'autre et faciliter les connexions tubulaires entre eux (Xiang et al., 2013).

### ➤ **Le rôle de l'actine dans la régulation de la morphologie du Golgi**

En plus des microtubules, les filaments d'actine sont également impliqués dans le transport et le maintien de la structure de Golgi, Mais les mécanismes sous-jacents restent largement inconnus. L'inhibition de la dynamique de l'actine par l'utilisation d'agents dépolymérisant ou stabilisant des filaments d'actine aboutit à une morphologie compacte du Golgi (Egea et al., 2006). Peu de choses sont connues sur la fonction de l'actine dans la dynamique de Golgi pendant la mitose. La seule indication est venue d'une étude dans les cellules S2 de drosophile, dans lesquelles les empilements de Golgi sont dupliqués et existés sous forme de paires avant la division cellulaire. Cette étude a montré que la dépolymérisation de des filaments d'actine conduit au doublement du nombre d'élément de Golgi et de RE. En plus, cette étude a montré que chaque appareil de Golgi est organisé comme une paire d'empilements maintenus ensemble par un mécanisme dépendant de l'actine, à la fois chez la drosophile et dans des cellules humaines (Kondylis et al., 2007).

#### **7.4.3. La relation entre l'appareil de Golgi et les centrosomes**

Les centrosomes sont les principaux centres de l'organisation des microtubules et ils sont impliqués dans la localisation périnucléaire de l'appareil de Golgi et dans l'exocytose où les vésicules de transport sont déplacées sur les microtubules d'origine centrosomale.

Cependant, des études récentes concernant les protéines de la matrice du Golgi indiquent une relation bidirectionnelle entre l'appareil de Golgi et les centrosomes. Tout d'abord, des protéines de la matrice au cis-Golgi, comme la GM130 et la GMAP-210, recrutent la  $\gamma$ -tubuline et induisent la nucléation et l'assemblage des microtubules non-centrosomales (Rios, 2014)(Rivero et al., 2009) . Ensuite la protéine de matrice GCC185 du trans-Golgi recrute la protéine stabilisatrice des microtubules et la protéine CLASP qui sera associée à l'extrémité positive des microtubules pour stabiliser la croissance initiale de ces microtubules d'origine Golgienne (Efimov et al., 2007). Ces microtubules jouent un rôle important dans la localisation des centrosomes par l'appareil de Golgi. En fait, la réorientation des centrosomes dans les cellules stimulées est dépendante de la capacité de l'appareil Golgi à se réorganiser et de la phosphorylation de la protéine GRASP65 (Bisel et al., 2008).

D'ailleurs, la protéine GM130 contrôle l'organisation des centrosomes en se liant à la protéine GEF de cdc42, Tuba. La déplétion de la GM130 aboutit à un positionnement incorrect des centrosomes qui deviennent incapables d'organiser les

microtubules, ce qui entraîne une migration cellulaire défectueuse ainsi qu'une multiplication des centrosomes aboutissant à la formation des fuseaux mitotiques multipolaires aberrants et à des divisions mitotiques incorrectes (Kodani and Sütterlin, 2008),(Kodani et al., 2009).

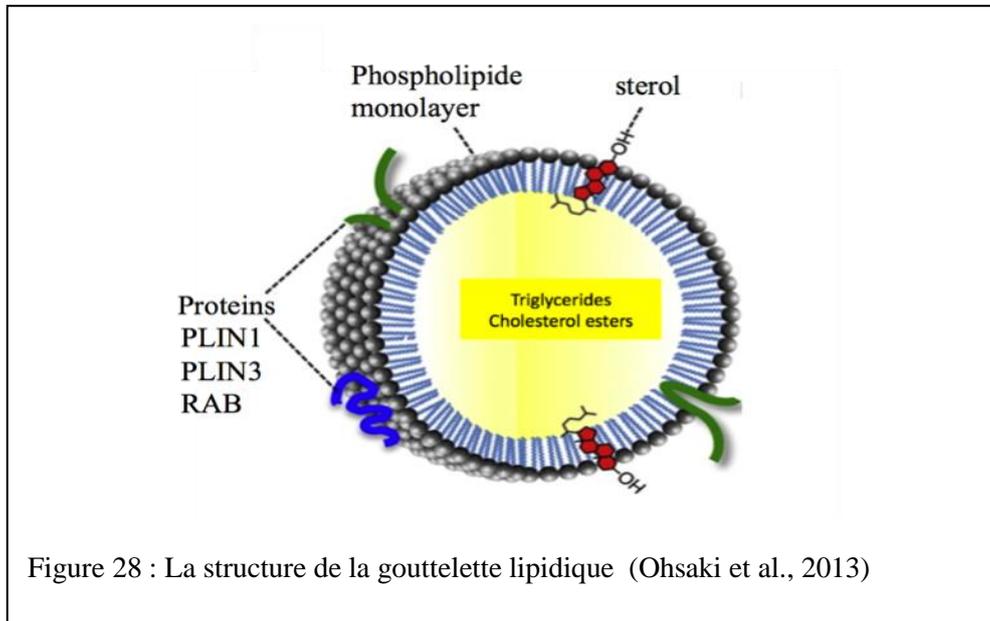
#### **7.4.4. La morphologie de l'appareil Golgi impacte ses fonctions :**

La perturbation de la morphologie normale du Golgi affecte directement le trafic des protéines et les modifications post-traductionnelles qu'elles subissent pendant leur passage à travers le Golgi. Par exemple, la dispersion du Golgi dans les cellules de mammifères par le traitement avec le nocodazole inhibe fortement le transport intra-Golgi des grands cargos sans altérer le taux de transport des petits cargos (Lavieu et al., 2014). Cependant, l'inhibition du réassemblage du Golgi par la déplétion des GRASP55 / 65 accélère le trafic des protéines, et affecte leur glycosylation, et conduit à un mauvais tri qui aboutit à une distribution dans l'espace extracellulaire des protéines destinées au lysosome (Xiang et al., 2013). Ce qui suggère que la morphologie normale de l'appareil Golgi est étroitement liée aux nombreux processus cellulaires vitaux (Joshi et al., 2015).

## 7.5. Les Gouttelettes lipidiques (GLs)

### 7.5.1. Structure

Les gouttelettes lipidiques (GLs) sont des organelles constitués d'un cœur hydrophobe de lipides neutres qui sont entourés d'une monocouche de phospholipides et de protéines associées (Bartz et al., 2007a) (figure 28).



#### ➤ Le cœur lipidique :

Le cœur lipidique des GLs est essentiellement composé de lipides neutres y compris: le triacylglycérol (TAG), le diacylglycérol (DAG), le cholestérol et les intermédiaires de synthèse de cholestérol (C) et les esters de cholestérol (EC) (Kuerschner et al., 2008).

#### ➤ La monocouche phospholipidique :

Bien que les GLs contiennent seulement 1-2% de phospholipides en poids, plus de 160 espèces moléculaires ont été identifiées. La phosphatidylcholine (PC) est la classe la plus abondante, suivie par la phosphatidyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol. La composition de la monocouche n'est pas toujours la même et peut varier d'un organisme à l'autre (Bartz et al., 2007b).

#### ➤ Les protéines associées :

En plus des phospholipides, la surface de GLs est recouverte de protéines. Depuis l'identification des périlipines comme marqueurs des GLs (Greenberg et al., 1991), plusieurs études ont révélé des centaines de protéines associées aux GLs dans une variété de types

cellulaires (Thiam et al., 2013). La majorité de ces protéines sont impliquées dans le métabolisme des lipides, comme par exemple dans la synthèse de PC, des stérols, ou du TAG. Certaines protéines ne sont pas directement impliquées dans le métabolisme des lipides mais sont impliquées dans le contrôle des propriétés de surface des GLs. Par exemple les périlipines sont supposées protéger les GLs de la lipolyse en protégeant les TAG à l'intérieur des GLs de l'effet des lipases (Brasaemle et al., 2000).

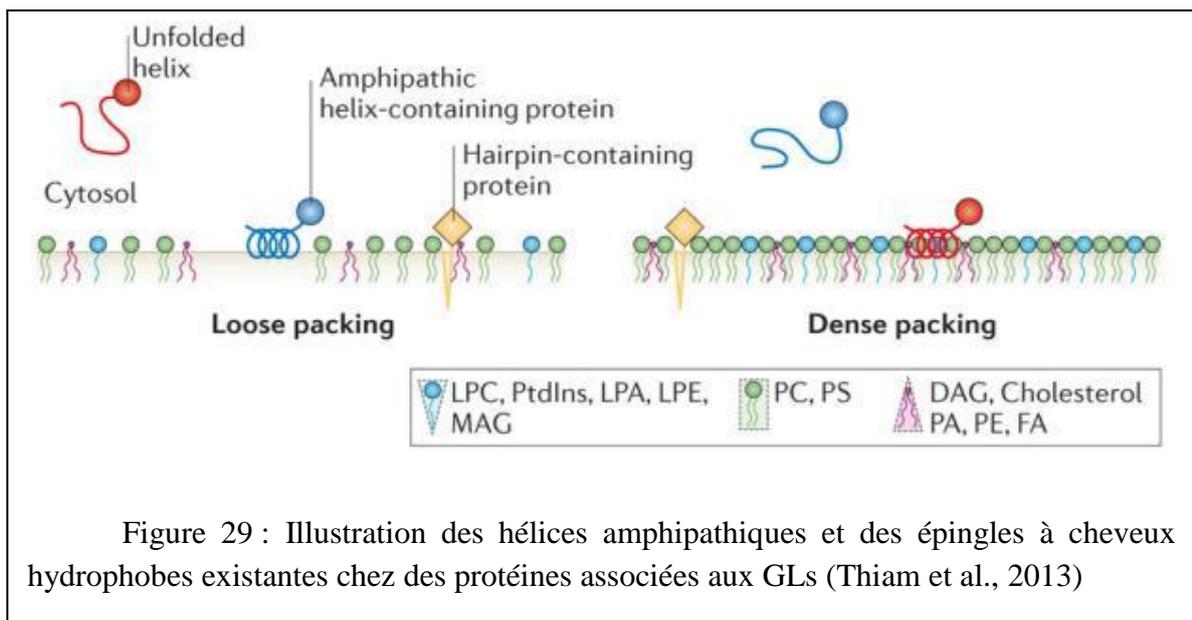
❖ **Les protéines associées aux GLs dans les cellules hépatiques :**

Les protéines prédominantes des GLs d'un hépatocyte sont les membres de la famille périlipine. On distingue aussi des protéines comme l'HIG2 (*hypoxia-inducible protein 2*) (Gimm et al., 2010), la famille des protéines CIDE (*the celldeath-inducing DFFA-likeeffector*)(Gong et al., 2009), et la PNPLA3 (*patanin-like phospholipase domain-containing 3*) (Ruhanen et al., 2014) impliquées dans la régulation des GLs hépatiques.

❖ **Le ciblage des protéines aux GLs :**

Actuellement, les mécanismes de ciblage des protéines aux GLs sont largement inconnus. Cependant, au moins deux types des signaux de ciblage ont été identifiés:

- 1- L'hélice alpha amphipathique trouvée dans la CTP (*phosphocholine cytidyltransferase*) une enzyme impliquée dans la synthèse de PC (Krahmer et al., 2011)
- 2- L'épingle à cheveux hydrophobe trouvée dans les enzymes de synthèse de TAG (DGAT1, DGAT2) (Wilfling et al., 2013) (figure 29).



Cependant on ne sait pas pourquoi certaines protéines contenant une hélice amphipathique ou une épingle à cheveux hydrophobes peuvent spécifiquement cibler les GLs et s'y accumuler. Jusqu'à présent, aucun des lipides présents sur les GLs, n'est connu pour être impliqué dans le recrutement des protéines, contrairement à d'autres exemples, comme le système d'endocytose, où les phosphoinositides sont impliqués dans le ciblage des protéines (Thiam et al., 2013).

### **7.5.2. La formation des GLs**

Les triglycérides dans le cœur hydrophobe des GLs sont générés par la voie de biosynthèse lipidique dont l'étape finale est catalysée par les enzymes DGAT1 et DGAT2 (Pol et al., 2014). Ces enzymes catalysent la formation de TAG à partir d'un DAG et un acide gras activé (acyl-CoA). Les deux enzymes sont situées dans le RE où les TAGs s'accumulent entre les deux couches de sa membrane dans des sites privilégiés qui représentent les GLs naissants. Les GLs matures sont produits par une croissance continue de ces structures naissantes et finalement deviennent distinctes du RE, probablement par l'intermédiaire d'un processus de bourgeonnement (Thiam et al., 2013). Les phospholipides entourant les sites privilégiés (probablement dérivées de la face externe du RE) agissent comme des agents émulsifiants pour faciliter la formation des GLs. Les lipides induisant une courbure comme les lysophospholipides et DAGs, peuvent également contribuer à la formation des GLs (Thiam et al., 2013). Il est cependant probable que des protéines jouent un rôle dans le développement de la gouttelette naissante. Par exemple, en s'intégrant sur le côté cytosolique de la membrane du RE, elles peuvent stabiliser ou améliorer la courbure convexe initiale afin d'assurer que les GLs bourgeonnent à partir de la face cytoplasmique de la membrane du RE et pas dans la lumière du RE. La protéine PLIN3 (Tip47), qui se lie aux GLs naissantes sur la surface cytoplasmique du RE, est une bonne candidate pour cette fonction (Skinner et al., 2009). Suite au bourgeonnement de la GL, le DGAT2 qui est inséré dans une seule couche de la membrane du RE peut donc diffuser sur la surface des GLs. Il permet localement la croissance des GLs en favorisant la synthèse des TAG (Wilfling et al., 2013). Le corps hydrophobe de la GL peut également contenir des esters stéroïdes, dont la synthèse est catalysée par l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase. Selon le type et les conditions de la cellule, des esters stéroïdes ou des triglycérides peuvent être prédominants (Welte, 2015).

### 7.5.3. La régulation des GLs

#### ➤ L'augmentation de taille :

Quatre mécanismes ont été proposés pour expliquer comment les GLs peuvent augmenter leur taille :

#### 1- Le transport des lipides neutres du RE aux GLs :

L'augmentation de taille des GLs nécessite une addition des lipides neutres et des phospholipides de surface, qui sont synthétisés principalement dans le RE et sur les GLs. Les GLs sont souvent adjacentes au RE, et des sites de contact entre le RE et les GLs peuvent exister. Les phospholipides et les lipides neutres synthétisés dans le RE peuvent être efficacement transportés aux GLs à travers les sites de contact GL- RE (Yang et al., 2012).

#### 2- La croissance par la fusion des GLs :

La fusion des GLs est généralement un événement rare, mais elle peut se produire dans certaines conditions (Ariotti et al., 2012). La fusion des GLs est facilitée par les protéines SNAREs (Boström et al., 2007).

#### 3- Le transfert des lipides neutres :

C'est un processus beaucoup plus lent que la fusion des GLs qui se produit par l'intermédiaire d'une structure en forme de pont contenant la protéine Fsp27 (*fat-specific protein* 27 kDa). Ce processus est basé sur le transfert des lipides neutres de la GL la plus petite vers la plus grande via la différence de pression interne entre ces GLs (Gong et al., 2011).

#### 4- La synthèse lipidique sur les GLs:

Certaines GLs semblent augmenter leur taille sans fusion apparente et sans liaison avec d'autres GLs ou avec le RE. Il a été proposé que des lipides puissent être synthétisés sur ces GLs. Dans les cellules des mammifères, DGAT2 se localise sur la surface de GLs pour contribuer à ce processus (Kuerschner et al., 2008)(Wilfling et al., 2013). De même, la CCT, est localisée à la surface des GLs pour fournir ainsi suffisamment de PC pour répondre aux besoins de la GL en croissance (Krahmer et al., 2011).

### ➤ **La lipolyse et la dégradation des GLs :**

Le contraire de la croissance des GLs est le processus de rétrécissement (*shrinkage*), communément appelé la lipolyse (Thiele and Spandl, 2008). Stratégiquement, les TAG insolubles sont convertis en produits solubles (les acides gras et le monoacylglycérol) directement à la surface de la GL par l'action séquentielle de deux lipases, l'ATGL (adipeux triglycéride lipase) et la HSL (hormone-sensitive lipase) (Zechner et al., 2005)(Zechner et al., 2012). Les périlipines jouent un rôle clé dans l'organisation et la régulation de ce processus (Brasaemle and Wolins, 2012). Un stimulus externe de lipolyse active les récepteurs adrénergiques ce qui déclenche la phosphorylation des protéines périlipines ainsi que celle d'autres protéines par la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc. Ceci aboutit à deux effets : tout d'abord les GLs se dispersent dans la cellule puis se fragmentent en plus petites. Ce processus est induit par la phosphorylation des périlipines sur plusieurs résidus de serine (Marcinkiewicz et al., 2006)(Miyoshi et al., 2007). Ce réarrangement morphologique des GLs augmente la surface d'accès des lipases aux GLs et améliore la deuxième réaction, qui est le recrutement dynamique de l'ATGL et HSL sur les GLs pour la dégradation des TAG (Miyoshi et al., 2006).

Un autre élément qui joue probablement un rôle de régulation de la lipolyse est la petite GTPase Rab18. Cette protéine se localise sur une sous-population des GLs (Martin et al., 2005). En effet une stimulation de la lipolyse augmente le recrutement de Rab18 sur les GLs. Ce recrutement déplace ADRP et induit un contact avec les membranes du RE pour faciliter l'utilisation des lipides libérés au cours de la lipolyse (Thiele and Spandl, 2008).

Dans les cellules hépatiques, les mécanismes spécifiques qui déterminent le destin d'une GL sont inconnus. Néanmoins, il a été proposé que des sous-groupes de GLs avec une composition lipidique et protéique distinctes soient ciblés pour la lipolyse, soit par la sécrétion sous forme de VLDL, soit pour le stockage des lipides à long terme.

Finalement, comme les autres organelles cellulaires, des GLs pourraient être captées par les autophagosomes, qui fusionneraient avec les lysosomes pour former les autolysosomes. Les enzymes hydrolytiques de lysosomes détruiraient le contenu de l'autophagosome. Les TAGs, en particulier, sont principalement hydrolysés par la lipase acide lysosomale (LAL)(Singh et al., 2009)

### ➤ **La mobilité des GLs :**

Le cytosquelette joue un rôle dans le contrôle de la distribution des GLs. Certaines GLs se déplacent selon un mouvement directionnel le long des microtubules, ce qui est cohérent avec la présence de la dynéine et de la kinésine-1 sur les GLs (Boström et al., 2005). Cependant la plupart des GLs montrent un mouvement brownien à courte distance, ce qui suggère que la distribution des GLs est également affectée par des facteurs tels que les filaments intermédiaires qui pourraient limiter ces mouvements (Franke et al., 1987).

#### **7.5.4. Rôle physiologique des GLs**

Les GLs sont les sites où les cellules stockent les lipides neutres tels que les TAGs, les esters de stérols. Ces lipides peuvent ensuite être utilisés en cas de besoin par la cellule pour produire de l'énergie, des composants membranaires et des molécules lipidiques pour la signalisation cellulaire (Walther and Farese, 2012).

Les GLs ont cependant un rôle bien au-delà du simple stockage. Par exemple, les GLs protègent la cellule de la lipo-toxicité induite par les acides gras (Kohlwein, 2010). Les protéines présentes dans la monocouche phospholipidique jouent un rôle non seulement dans le métabolisme des lipides, mais aussi dans le développement (Li et al., 2012), dans l'interaction hôte-pathogène et dans la réponse immunitaire (Saka and Valdivia, 2012).

De plus, les GLs jouent des rôles centraux dans le métabolisme et l'homéostasie cellulaire. On les trouve dans la presque totalité des cellules eucaryotes et dans plusieurs organismes procaryotes (Wältermann and Steinbüchel, 2005). Elles fournissent de l'énergie pour l'organisme et, chez les mammifères, les GLs sont impliquées dans la régulation de l'appétit à distance par la libération des adipokines (Scherer, 2006).

## **7.6. Virus de l'hépatite C (VHC)**

### **7.6.1. Généralités**

La découverte du VHC a débuté par la mise en évidence d'un agent infectieux associé à une hépatite non A non B après une transfusion sanguine (Feinstone et al., 1975). En 1989 Choo et ses collègues ont montré que l'agent responsable de l'hépatite non A non B était un virus à ARN de la famille flaviviridae (Choo et al., 1989) et appelé le virus de l'hépatite C (Choo et al., 1990). L'infection par le VHC représente une cause majeure des maladies du foie, aboutissant dans 80% des cas à une hépatite chronique qui peut évoluer vers une cirrhose et un cancer du foie (Lozano et al., 2012). Environ 185 millions d'individus, soit 2,8% de la population mondiale, sont infectés par le VHC (Mohd Hanafiah et al., 2013)(Messina et al., 2015)(Wandeler et al., 2015).

### **7.6.2. Pathogénèse**

L'infection par le VHC est une cause majeure d'hépatite chronique définie par une infection persistante de 6 mois, une sérologie VHC positive et la présence de l'ARN du virus dans le sang. Dans la plupart des cas, la maladie est asymptomatique. Son évolution est une fonction de l'âge, du sexe et dépend de nombreux facteurs aggravants comme l'alcool, le surpoids et le génotype du virus.

La physiopathologie de l'hépatite C chronique est liée à l'inflammation induite par la réponse immune dirigée contre les antigènes du virus. De plus, les patients atteints d'hépatite virale C chronique développent dans 40 à 60% des cas une stéatose. La stéatose est associée au risque de progression de la fibrose et de la cirrhose hépatique. La fibrose est le résultat de l'augmentation du dépôt et de la production des protéines de la matrice (fibrogénèse) et de la diminution de la dégradation de ces protéines (fibrolyse). Le degré de fibrose est évalué semi-quantitativement par une analyse histologique d'un prélèvement hépatique en utilisant le score METAVIR qui définit 4 stades de fibrose (Poynard et al., 1997). Le stade ultime de la fibrose est la cirrhose. Le délai de développement de la cirrhose est très variable, de 10 à 40 ans après contamination par le virus (Fattovich et al., 1997)(Poynard et al., 2001). Elle se caractérise par la destruction de cellules hépatiques et leur régénération sous forme de nodules de régénération entourés par du tissu fibreux et conduit à la perte des fonctions du foie. Le stade ultime de la pathologie liée au VHC est le carcinome hépatocellulaire (CHC). Dans les pays occidentaux, le CHC est la plus fréquente des tumeurs épithéliales primitives du foie ; il se développe le plus souvent sur une cirrhose. L'infection chronique par le VHC fait partie avec

le syndrome dysmétabolique et la consommation excessive d'alcool des principaux facteurs de risque de survenue d'un CHC (Lau and Lai, 2008)(Cabrera and Nelson, 2010). Aucune chimiothérapie n'est efficace dans le CHC (Schlachterman et al., 2015). Actuellement, la transplantation apparaît comme l'option thérapeutique optimale car elle conduit non seulement à l'ablation de la tumeur, mais aussi au remplacement de l'organe qui est susceptible d'être le siège d'une nouvelle tumeur. Malgré les grandes avancées récentes dans les stratégies de traitement, les infections chroniques restent responsables d'une grande proportion des décès liés aux maladies du foie, et principalement le CHC et la cirrhose associé à l'infection (Zoulim et al., 2015).

### **7.6.3. Variabilité génomique du VHC**

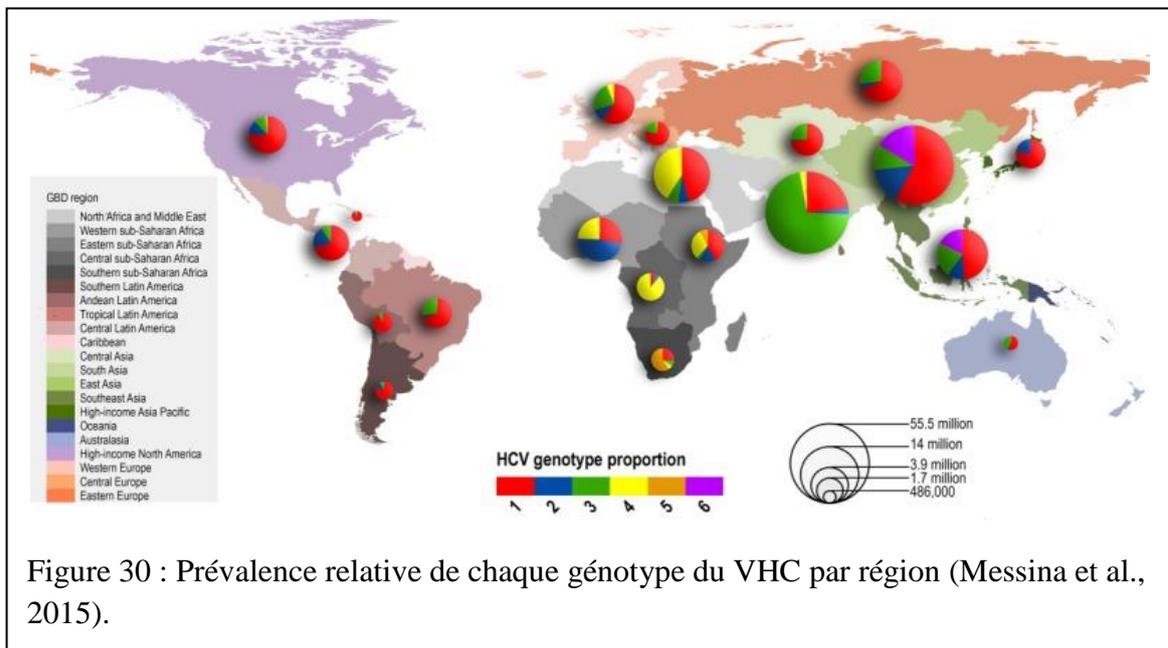
Le virus de l'hépatite C présente une variabilité génétique importante, en raison de l'absence d'activité correctrice exonucléasique de l'ARN polymérase virale (NS5B) qui entraîne un taux d'erreur d'environ  $10^{-3}$  substitutions nucléotidiques par site et par an (Ogata et al., 1991), (Okamoto et al., 1992) .

Le niveau élevé de réplication du virus ( $10^{12}$  particules virales au cours d'une hépatite chronique) associé à une absence de correction des erreurs de transcription entraîne l'émergence de nombreux variants viraux. L'analyse phylogénétique des séquences de différentes souches du VHC isolées dans différentes zones géographiques a permis d'identifier 7 génotypes, numérotés de 1 à 7 décomposés en sous-type désignés par une lettre minuscule après la numérotation du génotype (Kuiken and Simmonds, 2009) (figure 30).

Les différents génotypes et sous-types ne sont pas uniformément répartis dans le monde. Les génotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 2c et 3a, sont présents dans les pays industrialisés, avec une prédominance pour le génotype 1a, 1b en Europe et aux USA et le génotype 1b présente une prévalence proche des 100% au Japon. Le génotype 3a, présente une prévalence plus faible aux Etats-unis qu'en Europe. Le génotype 4 est surtout représenté au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, le génotype 5 est présent uniquement en Afrique du Sud , le génotype 6 est surtout localisé en Asie et enfin le génotype 7 aurait son origine dans le centre Afrique (Zein, 2000).

Pendant l'évolution de la maladie, de nouveaux variants viraux apparaissent chez le patient. Ils sont issus du même génotype mais génétiquement distincts, appelés quasi-espèces. La quasi-espèce comprend un ou plusieurs variants majoritaires et une multitude d'autres variants présentant une homologie de séquence de 90% (Pawlotsky, 2003). En circulant sous

forme de quasi-espèces, le virus assure sa persistance virale en sélectionnant des variants résistants à leur environnement immunologique au cours de l'infection. Les traitements antiviraux exercent aussi des pressions plus ou moins fortes induisant des changements au sein de la quasi-espèce (Sakai et al., 1999)(Shimizu et al., 1997) .



#### 7.6.4. Traitement du VHC

Il n'existe pas de vaccin contre le VHC. Jusqu'en 2011, le traitement standard pour le VHC était l'interféron pégylé plus ribavirine (PR) pendant 24 semaines ou 48 semaines. Ce traitement aboutissait à une guérison 45% chez les patients infectés par VHC de génotype 1. Au cours des cinq dernières années, d'énormes progrès dans le traitement de cette maladie ont été réalisés avec la mise sur le marché de médicaments antiviraux à action directe (*direct acting antiviral drugs* : DAAs) qui a fait considérablement progresser les taux de guérison. La première génération de DAAs avec des inhibiteurs de la protéase (IP) utilisés en combinaison avec PR ont poussé les taux SVR jusqu'à 75% (Welsch et al., 2012).

Avec le développement des nouveaux DAAs (inhibiteurs nucléotidiques et non nucléotidiques de la polymérase NS5B, et des inhibiteurs de la protéine NS5A), les taux de guérison sont encore améliorés. Une combinaison des médicaments DAAs, utilisée sans l'IFN avec ou sans *ribavirine*, produit des taux de guérison de 90% à 100% en fonction du génotype. Ces nouveaux traitements efficaces et bien tolérés offrent des nouvelles possibilités pour les patients ne répondant pas au traitement PR (van der Meer et al., 2014). Cependant, ces nouveaux traitements sont très onéreux et jusqu'ici peu de patients ont pu en bénéficier.

### **7.6.5. Les particules virales**

Les particules virales ont une forme globulaire irrégulière d'environ 50–80 nm (Catanese et al., 2013) constituée d'une bicouche lipidique riche en triacylglycérol et contient les protéines apoB, apoE, APOC1, C2 et C3, et les protéines virales core, E1 et E2 (André et al., 2002)(Meunier et al., 2008)(Bartenschlager et al., 2011). A l'intérieur de la bicouche lipidique, une capsid composée de la protéine core et des protéines d'enveloppe contient l'ARN viral (André et al., 2002). Chez les patients infectés, la densité des particules virales est très hétérogène allant de 1,25 g / ml à moins de 1,06 g / ml (André et al., 2002). L'infectiosité des particules est inversement proportionnelle à la densité, les particules de basse densité étant beaucoup plus infectieuses que les particules de haute densité (Hijikata et al., 1993).

### **7.6.6. Structure et organisation du génome du VHC**

Le génome de VHC est un ARN de 9.6 Kb simple brin de polarité positive qui se compose d'une région 5' NTR, contenant un site interne d'entrée de ribosome (*internal ribosome entry site* (IRES)), un cadre de lecture ouvert qui code pour les protéines structurales et non structurales et un 3'-NTR (Reed and Rice, 2000) (Figure 32). Outre, son rôle primordial dans l'initiation de la traduction de l'ARN viral du VHC, l'IRES est également nécessaire pour la réplication de l'ARN.

### **7.6.7. Les protéines de VHC**

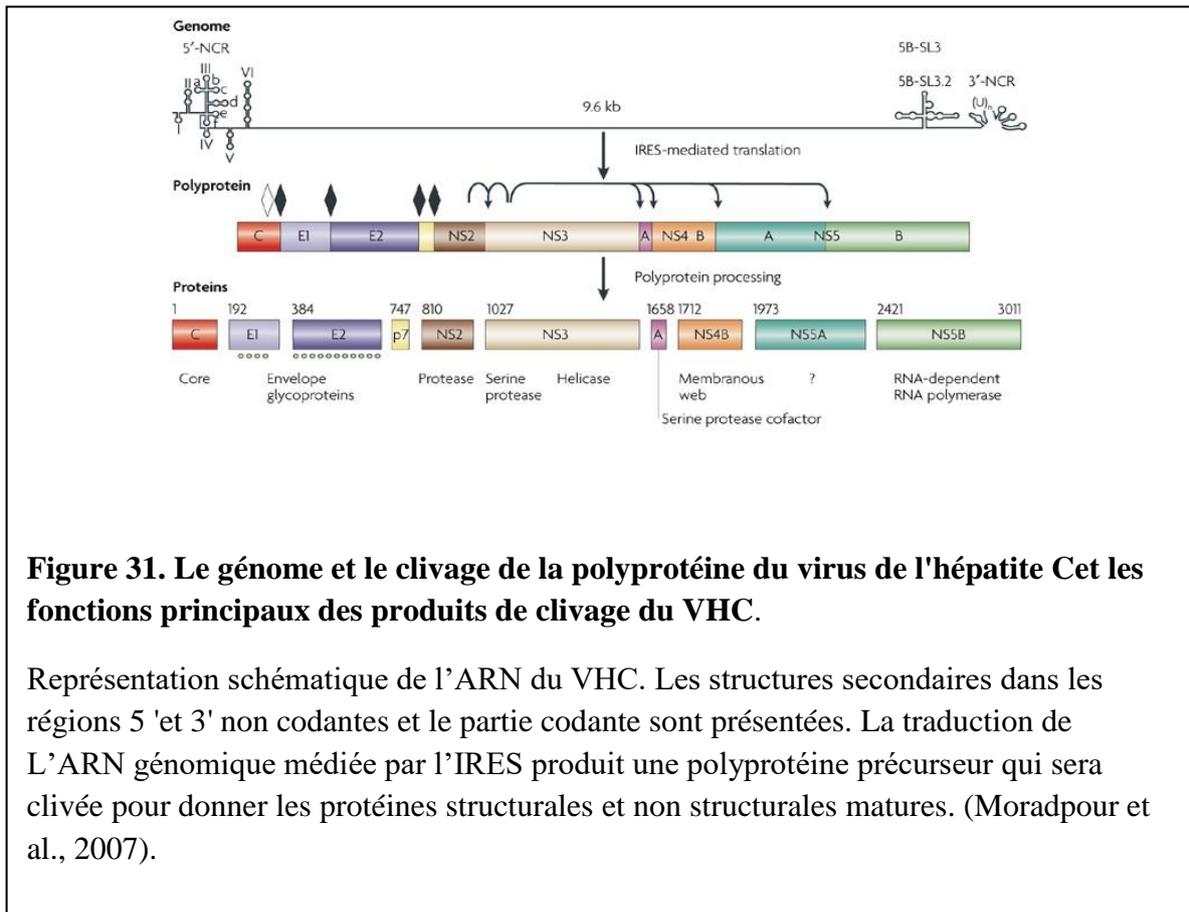
Lors de l'infection de la cellule par le VHC, l'ARN viral est directement traduit en une polyprotéine (environ 3000 acides aminés) qui va être clivée en 10 protéines, dont trois sont des protéines structurales et les autres des protéines non structurales (Figure 32).

Les protéines structurales sont générées à partir de la région N-terminale de la polyprotéine. Ces protéines sont impliquées dans la construction de la particule virale et comprennent: la protéine core et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.

Les protéines non structurales comprennent la protéine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Elles assurent la réplication de l'ARN viral et elles sont impliquées dans l'assemblage des virions (Lohmann et al., 1999).

Les protéases de l'hôte sont impliquées dans le clivage des protéines structurales, alors que les protéines virales non structurales sont clivées par les protéases virales NS2 et NS3. La

jonction NS2-NS3 est clivée par l'activité protéase intramoléculaire NS2 / 3 (Hijikata et al., 1993) (figure 31).

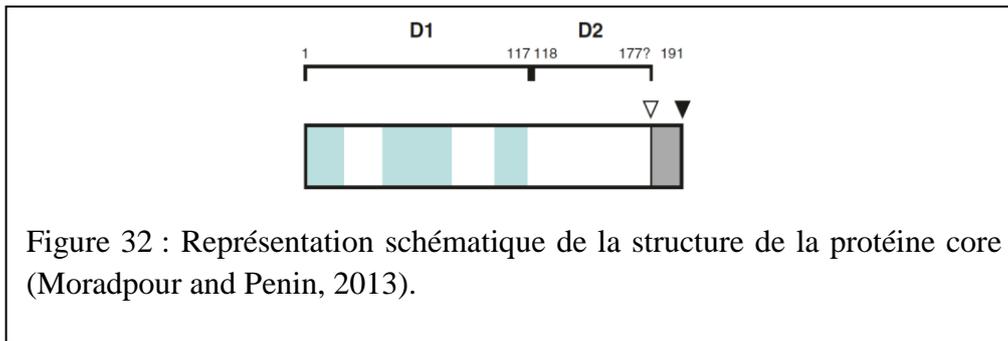


➤ **Les protéines structurales :**

❖ **La protéine de capsid (core) :**

La protéine de capsid est la première protéine codée par l'ARN viral et forme la nucléocapsid virale entourant l'ARN du virus. Elle est d'abord clivée par une « signal peptidase » (SP) cellulaire au niveau d'une séquence signal (SS) située à son extrémité C-terminale. Ce clivage libère la forme immature de la protéine basique de 191 aa (McLauchlan, 2000). Un deuxième clivage protéolytique se produit au niveau du peptide signal via une « signal peptide peptidase » (SPP), donnant lieu à une forme plus courte, de 173 aa-179aa, qui correspond à la protéine mature de la capsid de 21 kDa, localisée majoritairement dans le cytoplasme (Moradpour et al., 2007).

La protéine core est formée de deux domaines. Le domaine D1 de 117 a.a. contenant trois segments hydrophiles, et le domaine D2 hydrophobe constitué des acides aminés de 118 à 177 avec deux hélices alpha (Boulant et al., 2005) (figure32).



La protéine de capsid interagit avec de très nombreuses protéines et modules cellulaires et régule de ce fait la signalisation cellulaire, la transcription de gènes, la prolifération et l'apoptose cellulaires (de Chassey et al., 2008).

Une autre protéine produite par un décalage de la phase de lecture a été identifiée, il s'agit d'une protéine de 14 KDa appelée ARFP (*Alternatif Reading Frame Protein*) ou simplement la protéine F. Mais le rôle de cette protéine dans la réplication et la pathologie virale reste inconnu (Vassilaki et al., 2008).

#### ❖ Les glycoprotéines virales E1 et E2 :

E1 (35 KDa) et E2 (70 KDa) sont des protéines glycosylées, transmembranaires, qui forment ensemble un hétérodimère qui est considéré comme le principal composant de l'enveloppe virale.

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont clivées par la peptidase cellulaire (SP) au niveau de la membrane du RE. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont des protéines membranaires de type I comportant toutes les deux un ectodomaine N-terminal de 160 et 334 aa respectivement, et un domaine transmembranaire C-terminal d'une trentaine d'acides aminés (Cocquerel et al., 2000). Les domaines transmembranaires ont une double fonction : ils permettent d'une part l'ancrage des glycoprotéines dans la membrane du RE et, d'autre part, ils jouent un rôle important dans la formation des hétérodimères non-covalents E1/E2 (Penin et al., 2004), (Sabahi et al., 2014). Les deux glycoprotéines d'enveloppe sont essentielles à l'attachement du virus aux récepteurs membranaires induisant ainsi la fusion du virus avec la membrane cellulaire et l'entrée du virus dans la cellule hôte.

De plus, la glycoprotéine E2 joue également un rôle central dans l'échappement viral. En effet, la protéine E2 contient trois régions hypervariables génétiquement (HVR). La région HVR1 présente des résidus conservés chargés positivement se liant aux lipides et aux glycosaminoglycans (GAGs) des membranes chargés négativement. Cette région HVR1 est

de ce fait, impliquée dans l'attachement du virus à la cellule hôte (Penin et al., 2001). D'ailleurs, il a été montré que l'interaction de la protéine E2 avec CD81, *in vitro*, inhibe l'activation des lymphocytes T et des cellules NK (*Natural killer*) et permet ainsi l'établissement de l'infection chronique (Crotta et al., 2002)(Tseng and Klimpel, 2002).

#### ❖ **La protéine P7 :**

P7 est une protéine transmembranaire de 63 a.a. (7 KDa) contenant deux domaines transmembranaires qui l'orientent vers la lumière du RE. Du fait de ces caractéristiques, la protéine p7 est classée dans la famille des protéines viroporines. P7 se polymérise en hexamères et heptamères formant ainsi des canaux membranaires. P7 est indispensable pour l'infection virale. Des données *in vivo*, ont montré que la protéine p7 était nécessaire à la réplication du virus (Sakai et al., 2003). De plus, un des rôles de la protéine p7 serait d'équilibrer le pH dans les compartiments cellulaires afin de rendre possible la production de particules virales pendant le processus de maturation celles-ci (Wozniak et al., 2010). Une étude récente montre que la protéine p7 est requise pour les étapes ultimes d'assemblage du génome viral (Gentsch et al., 2013).

#### ➤ **Les protéines non structurales**

##### ❖ **La protéine NS2**

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 23 kDa. NS2 est composée d'un domaine transmembranaire à son extrémité N-terminale et un domaine catalytique dans la partie C-terminale. P7 et NS2 sont séparées par la « signal peptidase », alors que le clivage entre NS2 et NS3 se fait par la cystéine protéase auto-catalytique formée par le domaine C terminal de NS2. Ce clivage est indispensable pour la stabilité de NS3 et la réplication d'ARN (Welbourn et al., 2005)(Gorzin et al., 2012). De plus, NS2 est impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales par son interaction avec des protéines structurales et non structurales du VHC (E2, p7, Ns3 et NS5A) (Popescu et al., 2011), (Suzuki et al., 2013).

##### ❖ **Le complexe NS3 –NS4A**

NS3 est une protéine bi-fonctionnelle de 70 kDa qui possède une activité sérine protéase localisée dans le premier tiers de la région N-terminale et une activité ARN hélicase / NTPase localisée dans les deux tiers de la région C-terminale (Tai et al., 1996). NS4A est une petite protéine transmembranaire de 8 kDa qui interagit via son domaine C-terminal avec les membranes et d'autres composants de la réplication. Elle forme avec la protéine NS3 un

complexe nécessaire pour le clivage de la polyprotéine et la réplication virale. En effet, l'activité protéase NS3/4A, est responsable du clivage des jonctions NS3/4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B. Cette activité est indispensable à la formation du complexe de réplication. D'ailleurs, l'activité ARN hélicase permet de séparer les doubles brins de l'ARN et de faciliter l'accès de l'ARN polymérase virale, NS5B, aux structures très repliées comme l'IRES en 5'NTR. Outre son rôle dans le cycle viral, NS3/4A interfère avec plusieurs voies de la signalisation cellulaire intervenant ainsi dans la carcinogenèse et dans l'échappement du virus à la réponse immunitaire (Dubuisson, 2007). D'ailleurs, en interagissant avec les récepteurs TGF $\beta$  type I, le complexe NS3-NS4A pourrait induire la fibrose hépatique (Sakata et al., 2013).

#### ❖ La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe transmembranaire d'environ 30 kDa. Sa fonction reste encore mal connue, mais elle est associée aux autres protéines non structurales dans le complexe de réplication virale et elle est impliquée dans la formation des structures membranaires du site de la réplication virale (*membranous web*) (Dubuisson, 2007)(Bartenschlager and Lohmann, 2000). La modification post traductionnelle (palmitoylation) de la protéine NS4B est essentielle pour la réplication virale, (Krekulová et al., 2006).

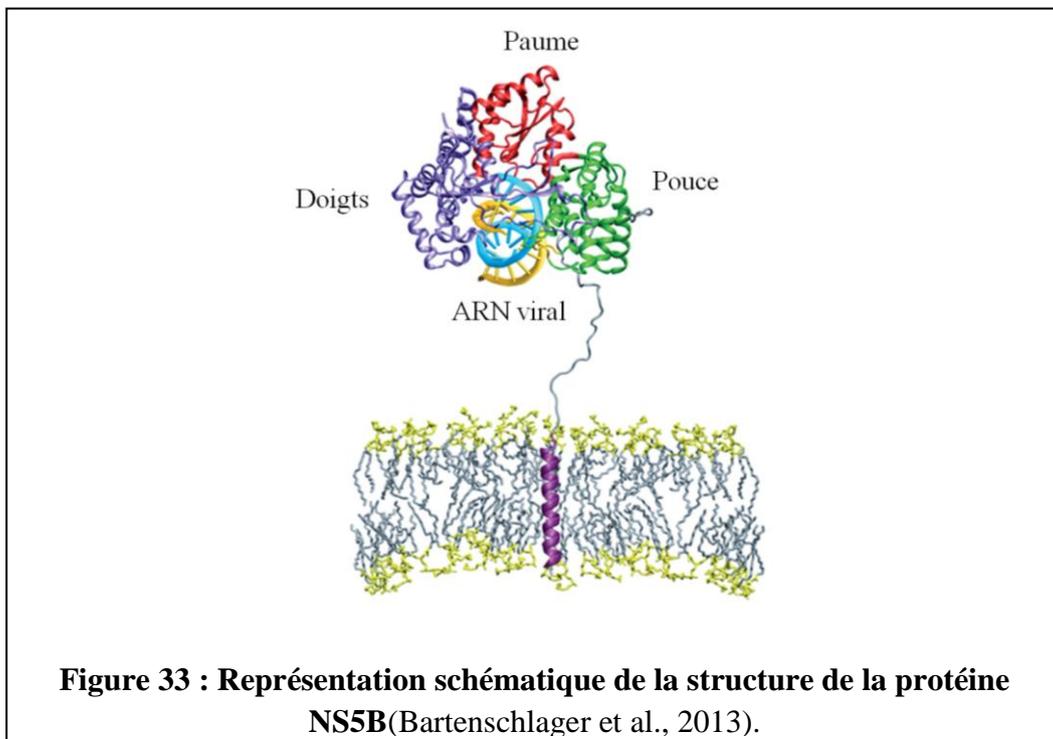
#### ❖ La protéine NS5A

La protéine NS5A est une phosphoprotéine associée aux membranes cellulaires. On retrouve deux formes de cette protéine, une à 56 kDa et l'autre à 58 kDa, correspondant aux formes phosphorylées. La structure 3D de cette protéine a permis de mettre en évidence trois domaines numérotés de I à III séparés par des séquences de faibles complexités (*low complexity sequence* ou LCS) (Tellinghuisen et al., 2004)(Tellinghuisen et al., 2005). Le domaine I contient au niveau de la région N-terminale l'hélice- $\alpha$  amphipathique, responsable de l'association de NS5A à la membrane et un motif d'attachement au zinc (Tellinghuisen et al., 2005). Ce domaine permet l'interaction protéine-protéine essentielle à la formation et la fonction du complexe de réplication du génome viral. Le domaine II, contient une région appelée ISDR (*interferon sensitivity determining region*) (Tellinghuisen et al., 2004). L'ISDR est impliquée dans l'interaction avec la protéine cellulaire PKR induite en réponse à l'interféron (Gale et al., 1998). L'interaction entre ISDR et PKR inhibe l'activité antivirale de cette dernière. Le domaine III est une des régions les moins conservées du génome du VHC

(Tellinghuisen et al., 2004). Cependant, ce domaine est crucial pour l'assemblage des particules virales. En effet, la perte du domaine III de NS5A perturbe la formation des particules virales infectieuses car elle empêcherait la co-localisation de la protéine de capsid avec NS5A au niveau des GLs (Appel et al., 2008). De plus l'interaction de NS5A avec l'apolipoprotéine cellulaire ApoE est indispensable pour l'assemblage des particules virales et la libération des virions infectieux (Benga et al., 2010).

#### ❖ La protéine NS5B

La protéine NS5B est une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp : *RNA-dependent RNA polymerase*) qui catalyse la synthèse d'ARN viral. Cette protéine contient 591 a.a. et a un poids moléculaire de 68 KDa. La structure de NS5B est en forme de main droite, avec le pouce, la paume, et les doigts. L'interaction de la région doigts et pouce forme le site polymérase actif (Bressanelli et al., 1999) (Figure 33). La région C-terminale de NS5B forme un domaine transmembranaire  $\alpha$ -hélicoïdal qui est responsable de son ancrage dans la membrane du RE et de son orientation cytoplasmique (Moradpour et al., 2004). Cette protéine est un acteur majeur pour la réplication du génome viral. En effet, elle assure la synthèse des deux brins complémentaires. Le brin négatif complémentaire, intermédiaire de réplication, sert ensuite de matrice à la synthèse de grandes quantités d'ARN positif.



Le cycle du VHC comprend quatre étapes : L'entrée de virus, la traduction du génome et la maturation des protéines virales, la réplication du génome et l'assemblage et la sécrétion des particules virales.

### ➤ L'entrée du virus

L'attachement initial du VHC sur la cellule est assuré par l'association du virion avec les protéines GAGs présentes sur la surface de l'hépatocyte (Koutsoudakis et al., 2006). Ensuite le virion pourrait interagir avec les récepteurs de LDL (LDL-R) par ses composantes lipoprotéiques (Owen et al., 2009).

Après la liaison initiale de la particule du VHC avec les récepteurs scavenger B 1 (SRB1) (Scarselli et al., 2002) et la tétraspanine CD81, la particule interagit avec les protéines des jonctions serrées Claudine 1 (CLDN1) et occludine (OCLN) et finalement pénètre dans les cellules par l'endocytose (étape 1) (Figure 34).

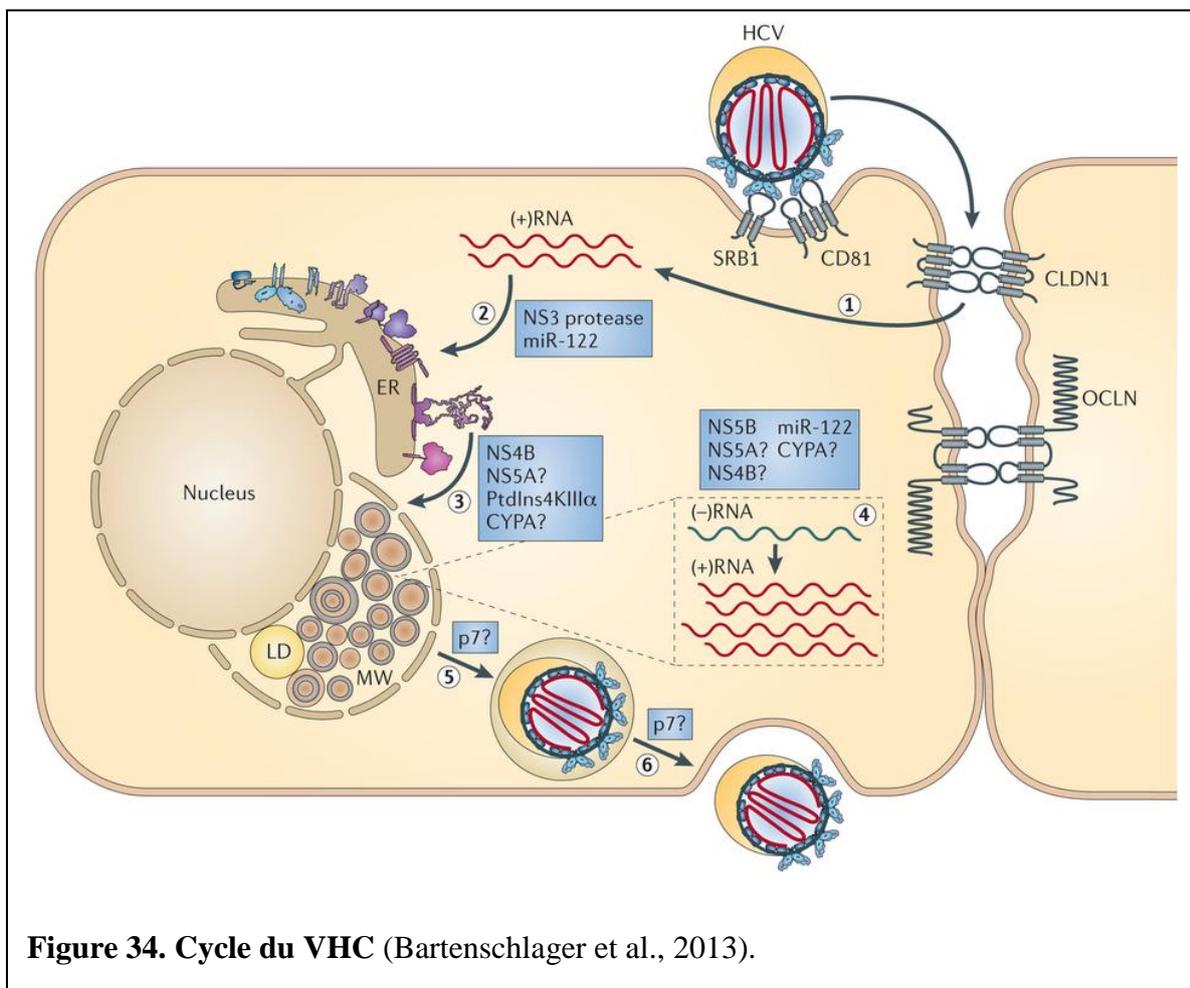


Figure 34. Cycle du VHC (Bartenschlager et al., 2013).

➤ **La traduction du génome et le clivage du polypeptide :**

Suite à sa libération dans le cytoplasme l'ARN viral est directement traduit par les ribosomes de l'hôte par l'intermédiaire de l'IRES. La sous-unité 40S ribosomale se lie au domaine II de l'IRES et recrute le facteur de l'initiation eIF3, tRNA et le GTP pour former la sous-unité ribosomale 48S. Finalement, le recrutement de la sous-unité ribosomale 60S aboutit à la formation du complexe ribosomal complet qui traduit le génome viral en polyprotéine (Hoffman and Liu, 2011). Cette polyprotéine sera clivée par les protéases cellulaires de l'hôte et les protéases virales pour donner dix protéines matures comme il a été détaillé plus haut.

➤ **La réplication virale :**

L'ARN simple brin positif est transcrit par la polymérase virale NS5B en ARN complémentaire d'une polarité négative qui va servir de matrice pour la synthèse multiple des ARN viraux. La synthèse d'ARN viral est catalysée à la fois par l'activité de NS5B et par d'autres protéines virales non structurales (NS), ainsi que par des facteurs de l'hôte, y compris par exemple la cyclophiline A (CYPA; également connu sous le PPIase A) et le microARN, miR-122. Les ARN positivement polarisés seront utilisés soit pour la traduction pour produire les polyprotéines virales, soit pour la formation des particules virales. La réplication virale est réalisée sur des membranes réarrangées du RE appelées « *membranous web* » (MW) (Gosert et al., 2003). Ces membranes sont biochimiquement modifiées pour créer un environnement lipidique particulier requis pour l'activité répliquative du VHC (Popescu et al., 2014). La formation et l'activité du MW ne sont pas encore bien comprises. D'ailleurs, les protéines virales NS4B et NS5A jouent des rôles dans le réarrangement de ces membranes (Egger et al., 2002)(Gosert et al., 2003) : NS4B induit la formation des vésicules à membrane unique alors que la présence de NS5A est nécessaire pour induire la formation des vésicules à double membrane (Romero-Brey et al., 2012)(Paul et al., 2014).

➤ **L'assemblage et la sortie des particules virales**

Les recherches au cours des dernières années ont montré que la formation des particules du VHC est étroitement liée à celle des gouttelettes lipidiques (GLs) qui pourraient servir de plateforme de montage. En fait, la production des particules virales est strictement liée au métabolisme des lipoprotéines à très basse densité (*very-low-density lipoproteins* (VLDL)) (Bartenschlager et al., 2011). Les particules virales intracellulaires naissantes ont une densité supérieure aux particules extracellulaires et elles acquièrent leur faible densité

dans le compartiment post-ER (Gastaminza et al 2006) (Gastaminza et al., 2008). Ces données indiquent que les particules virales subissent des modifications de la composition lipidique similaires à celles impliquées dans la voie d'assemblage des VLDLs.

Les détails de l'assemblage des particules du VHC ne sont pas encore tout à fait clairs, mais doivent impliquer l'action coordonnée des glycoprotéines d'enveloppe E1-E2 qui résident dans le RE, le recrutement de la protéine core associée aux GLs pour envelopper l'ARN viral et plusieurs facteurs viraux et des composants de la cellule de l'hôte. Les particules de VHC se forment par bourgeonnement du RE. L'interaction entre la protéine core associée aux GLs et NS5A est importante pour la première étape de ce processus, peut-être, par le déplacement de l'ARN du complexe de réplication vers les sites d'assemblage du virus. L'interaction entre p7 et les protéines NS2-NS3-4A est nécessaire pour recruter la protéine core aux sites d'assemblage du virus. La formation de la nucléocapside a vraisemblablement lieu au niveau du bourgeonnement du RE (Bartenschlager et al., 2011).

#### ➤ **La maturation du virus**

Les glycoprotéines E1-E2 présentes sur les particules virales extracellulaires subissent quelques modifications. Elles sont initialement assemblées en hétérodimères non covalents sur les particules virales intracellulaires, retrouvées associées au virion sous forme de grands complexes covalents stabilisés par des ponts disulfures. Ces modifications indiquent que les particules de virus ont traversé l'appareil de Golgi (Vieyres et al., 2010). Conformément à cela, Coller et ses collègues ont trouvé que la protéine core au cours de l'assemblage est transportée vers l'appareil de Golgi avant d'être transportée vers la membrane plasmique et libérée (Coller et al., 2012).

#### **Le rôle des GLs dans l'infection par VHC :**

Les GLs occupent un rôle central dans le cycle du VHC et elles sont spécifiquement ciblées par les protéines virales. L'accumulation des GLs dans le foie (la stéatose) est une complication fréquemment observée chez les patients infectés par le VHC.

Il est connu que les particules virales infectieuses sont associées aux lipoprotéines (Thomssen et al., 1993). Étant donné que les GLs fournissent les substrats lipidiques pour la production et la libération de VLDL des hépatocytes, il a été spéculé que l'attachement des protéines virales sur la surface des GLs, en particulier l'attachement de la protéine core pourrait faciliter l'interaction entre le virus et la voie de VLDL, pour promouvoir l'assemblage

du virus. Actuellement, d'après plusieurs études de génétique et de biologie cellulaire, il existe de nombreuses preuves pour étayer cette hypothèse (Filipe and McLauchlan, 2015).

L'assemblage du virion du VHC se produit en deux phases distinctes. La première phase est le rapprochement des GLs aux sites de réplication du VHC. Les sites de réplication sont localisés dans le MW, généré par les protéines non structurales (NS) du VHC (Targett-Adams et al., 2008). La protéine NS5A est présente à la fois sur les sites de réplication et sur la surface des GLs, et est capable de se lier avec les ARNs viraux (Huang et al., 2005) et la protéine core (Camus et al., 2013), ce qui suggère que NS5A agit éventuellement comme une navette entre les deux compartiments. Elle pourrait faciliter le transport de l'ARN viral du site de la réplication à la surface des GLs. Ceci faciliterait l'interaction du complexe de la réplication avec la protéine core, et permettrait l'encapsidation et la formation de la nucléocapside.

La protéine NS5A est recrutée sur les GLs et génère plusieurs interactions protéine-protéine.

- NS5A forme un complexe avec la protéine core et la DGAT-1 (Camus et al., 2013).
- NS5A associe à la Rab 18, ce qui facilite le recrutement de NS5A aux GLs (Salloum et al., 2013).
- NS5A se lie à TIP47 sur la surface des GLs et cette liaison est nécessaire pour la réplication du VHC (Vogt et al., 2013)

Des études basées sur l'imagerie de cellules vivantes, ont proposé que l'interaction de l'ARN viral avec la protéine core et la sortie de ce complexe ARN-protéine des GLs sous forme de virions naissants, nécessitent un complexe formé des protéines virales NS2 et NS3/4A (Stapleford and Lindenbach, 2011). Donc NS5A n'est pas le seul médiateur de l'initiation du processus d'assemblage. Les détails précis du processus d'assemblage ne sont toujours pas bien connus mais la participation des GLs dans la formation du virion est bien démontrée. Par exemple, la déplétion des GLs ou la modification de leur morphologie est suffisante pour diminuer la production de virions infectieux (Liefhebber et al., 2014).

La déplétion des GLs réduit la stabilité des protéines core et NS5A, indiquant un rôle important des GLs dans le maintien d'une quantité importante de ces protéines virales pour assurer la réplication et l'assemblage du virus (Liefhebber et al., 2014).

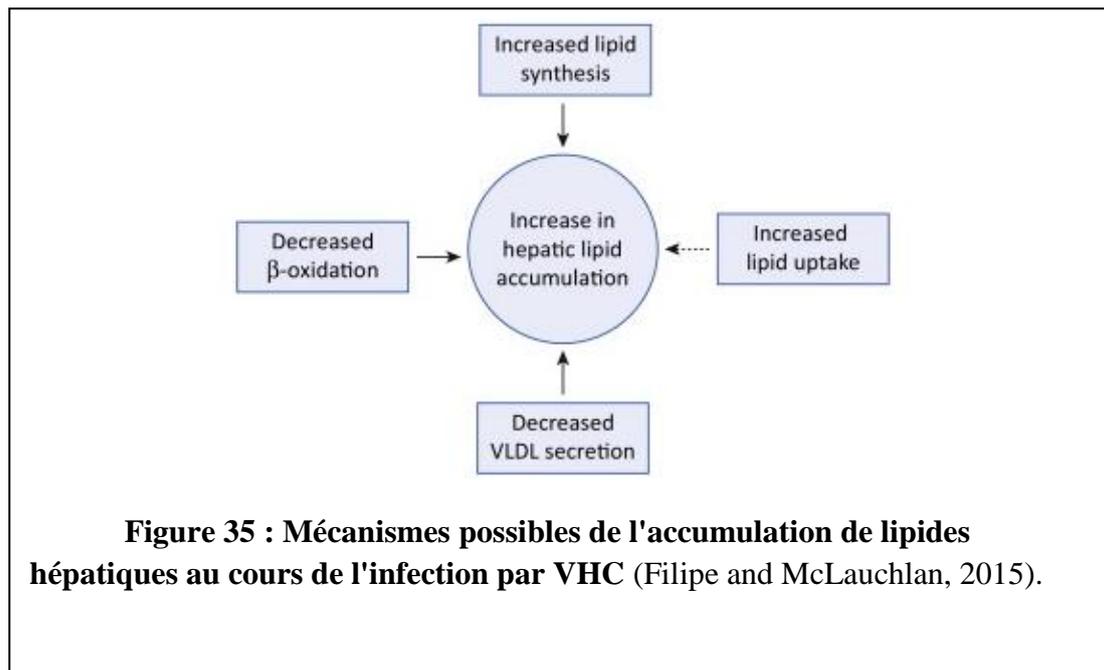
Finalement, les GLs sont impliquées dans la réponse de l'interféron après infection par le VHC. Les interférons sont connus pour perturber la réplication du VHC par l'induction

d'ISGs (*interferon-stimulated genes*), même si on sait peu sur leur mode d'action. Des études *in vivo* ont révélé que la vipérine, une protéine induite par l'interféron, est fortement induite dans des échantillons de foie des patients chroniquement infectés par le VHC (Helbig et al., 2005). L'expression exogène de la vipérine inhibe la réplication du VHC *in vitro* et cette protéine peut être détectée avec les protéines core et NS5A sur les GLs et au niveau des sites de la réplication du VHC (Helbig et al., 2011).

➤ **L'accumulation des GLs induite par VHC :**

Il existe plusieurs mécanismes possibles par lesquels le VHC pourrait modifier le métabolisme pour induire l'accumulation des lipides intra-hépatiques et il est probable que le changement métabolique conduisant à l'accumulation de lipides est multifactorielle. Par exemple, une augmentation de stockage de lipides serait favorisée par une combinaison de la biosynthèse des lipides, une diminution de  $\beta$ -oxydation et une réduction de la formation / sécrétion de VLDL. D'autres facteurs, plus indirects peuvent affecter le stockage des lipides sous forme de GLs dans les hépatocytes, comme la résistance à l'insuline et la réponse immunitaire à l'infection (Filipe and McLauchlan, 2015) (figure 35).

La résistance à l'insuline, associée à un diabète de type 2, peut induire une stéatose hépatique et en retour, la stéatose peut induire une résistance à l'insuline (Weickert and Pfeiffer, 2006). Il est possible que l'infection par le VHC provoque un dysfonctionnement des voies de signalisation de l'insuline par divers moyens. Il a été suggéré que l'infection par le VHC de génotype 3 peut déclencher la résistance à l'insuline par un mécanisme impliquant la phosphatase PTEN. L'expression réduite de PTEN, un régulateur de la signalisation de l'insuline, est corrélée avec la stéatose. L'analyse de biopsies du foie a révélé que PTEN était sous-exprimée chez les patients ayant développé une stéatose et infectés par le VHC de génotype 3 (Clément et al., 2011). FoxO1 (*forkhead box protein O1*) est un régulateur clé de la néoglucogénèse. En présence d'insuline, FoxO1 est phosphorylée, ce qui provoque son exclusion nucléaire et sa dégradation (Matsuzaki et al., 2003). Des études ont montré que l'infection par le VHC bloquait la phosphorylation de FoxO1 (Bernsmeier et al., 2014), ce qui inhibe probablement la relocalisation de la protéine du noyau vers le cytoplasme après stimulation par l'insuline. Cette perturbation de la dynamique de FoxO1 conduit à une augmentation de la gluconéogénèse par augmentation de la biosynthèse de glucose-6-phosphatase (G6P) (Banerjee et al., 2010) et augmente la synthèse des lipides en augmentant les niveaux de SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) et de FAS (*fatty acid synthase*) (Bose et al., 2014).



**Figure 35 : Mécanismes possibles de l'accumulation de lipides hépatiques au cours de l'infection par VHC (Filipe and McLauchlan, 2015).**

D'autres études ont montré que des protéines virales jouent un double rôle en augmentant les niveaux d'expression des gènes clés impliqués dans la gluconéogenèse tels que ceux codant pour la PEPCCK (*phospho enolpyruvate carboxy kinase*) et la G6P, ainsi que les niveaux d'expression de DGAT1, l'enzyme impliquée dans la synthèse du TAG (Banerjee et al., 2010)(Parvaiz et al., 2014). En conséquence, non seulement la gluconéogenèse est stimulée, mais la synthèse des lipides l'est aussi. Il est donc tentant de spéculer que la gluconéogenèse induite par le virus peut déclencher la synthèse des lipides. Une telle induction de la synthèse des lipides par l'infection se manifesterait par une augmentation des GLs (Bose et al., 2014).

La stimulation de la lipogenèse dans les cellules infectées pourrait s'expliquer par l'activation d'un mécanisme impliquant IKK $\alpha$ . Le NTR 3' d'ARN viral interagit avec DDX3, (une protéine de *DEAD box protein*), pour activer IKK $\alpha$  induisant sa phosphorylation et localisation nucléaire. À son tour, l'IKK $\alpha$  activé induit la lipogenèse par la médiation de SREBP-1 (Li et al., 2013). D'ailleurs, ce processus ne repose pas sur la traduction des protéines virales. Le VHC peut également augmenter le stockage des lipides intracellulaires en diminuant la consommation des acides gras par la  $\beta$ -oxydation. Des études *in vitro* montrent que l'infection par le virus ou l'expression de la protéine core seule diminuent l'expression de MCAD (*medium-chainacyl-CoAdehydrogenase*) et SCAD (*short-chain acyl-*

*CoAdehydrogenase*), qui sont, toutes les deux, impliquées dans la régulation de dégradation des acides gras par la  $\beta$ -oxydation, ce processus est contrôlé par FoxA2 (Bose et al., 2014).

Un deuxième mécanisme par lequel le VHC peut inhiber l'oxydation des acides gras est par la diminution de PPAR $\alpha$  (*peroxisomeproliferator-activatedreceptor  $\alpha$* ) observée chez les patients infectés par le VHC (Dharancy et al., 2005). PPAR $\alpha$  est un facteur de transcription nucléaire qui régule l'oxydation des acides gras dans les mitochondries et les peroxysomes (Pyper et al., 2010). Une étude récente a suggéré que l'expression de la PPAR $\alpha$  peut être inhibée complètement en stimulant les niveaux de miR 27 (microARN27) dans les cellules infectées par VHC (Singaravelu et al., 2014). Comme décrit ci-dessus, Le VHC exploite la voie de l'assemblage des VLDL et les voies de sécrétion dans le foie pour la production des particules virales infectieuses. En effet le VHC peut avoir un impact négatif sur la sécrétion des VLDL. De plus d'autres données montrent que la fraction de TAG dans les VLDL est plus faible chez les patients infectés par le VHC que chez les sujets témoins (Lambert et al., 2013).

## **8. Objectifs des travaux de thèse :**

### **Objectif 1 :**

Les septines lient les PIs mais le rôle de cette liaison dans leurs fonctions cellulaires comme la régulation des compartiments intracellulaires et l'établissement de la polarité cellulaire n'est pas encore bien compris.

Pour cela le premier objectif de ma thèse était d'étudier l'interaction de la septine 9 avec les PIs. Pour cela, nous avons réalisé la construction de mutants de la septine 9 incapables de lier les PIs afin d'investiguer les conséquences biologiques générées par ces mutants sur les fonctions cellulaires de la septine 9.

### **Objectif 2:**

L'investigation du rôle de la septine 9, des PIs et de leur interaction dans l'accumulation des GLs induite par le VHC représente le deuxième objectif des mes travaux de thèse.

Le VHC exploite et module plusieurs voies de signalisation cellulaires pour assurer la production des particules virales infectieuses. La voie du métabolisme des lipides est affectée par ce virus et en particulier les gouttelettes lipidiques sont accumulées au cours de l'infection virale. Le phosphatidylinositol PtdIns, substrat des PIs est un composant phospholipidique des GLs. Le rôle des PIs dans la régulation de GLs n'est pas encore bien compris. Sachant que la septine 9 se lie aux PIs, nous avons étudié la régulation de cette protéine au cours des différentes étapes de la maladie liée au VHC et son rôle dans la réplication virale. En plus nous avons étudié le rôle des PIs dans la régulation des GLs et également le rôle de l'interaction septine 9-PIs dans ce processus.



## 9. Résultats

### **Article 1 : Septin 9 binds the phosphoinositides via two polybasic domains implicated in Golgi assembly and apico-basal polarity**

**(article en preparation)**

Les septines peuvent se lier aux PIs par leur domaine polybasique (PB1) situé à l'extrémité N du domaine se liant le GTP (Zhang et al., 1999), (Bertin et al., 2010) et moduler ainsi les membranes contenant les PIs (Tanaka-Takiguchi et al., 2009). Depuis leur identification les septines ont toujours été associées à la morphogenèse du cortex des cellules (Rodal et al., 2005), (Weirich et al., 2008). Aucune étude n'a envisagé le rôle des septines dans la régulation de la morphologie des compartiments membranaires intracellulaires contenant des PIs comme par exemple l'appareil de Golgi.

Dans ce travail, nous avons étudié les bases structurales de l'interaction de la septine 9 avec les PIs et l'implication de cette protéine dans la régulation de la morphologie de l'appareil de Golgi, dans la sécrétion et la polarité cellulaire à travers l'interaction de cette protéine avec les PIs.

Dans cette étude, Nous avons identifié un deuxième domaine polybasique impliqué dans l'interaction de la septine 9 avec les PIs et montré que la délétion des deux domaines polybasiques est nécessaire pour inhiber complètement l'interaction de cette septine avec les PIs.

L'appareil de Golgi est un organite hautement dynamique, capable de se disperser et de se réassembler rapidement sous des conditions physiologiques et expérimentales (Marra et al., 2007)(Valente and Colanzi, 2015). Nos résultats démontrent que le rôle de la septine 9 dans la régulation de la morphologie de l'appareil Golgi, la sécrétion et la polarité cellulaire est dépendant de l'interaction de la septine 9 avec les PIs. Ces résultats précisent l'importance de cette interaction dans les fonctions des septines.

Les centrosomes sont le principal centre de l'organisation des microtubules. Leur orientation dans les cellules stimulées dépend de la capacité de l'appareil de Golgi à les réorganiser ce qui suggère un rôle essentiel de l'appareil Golgi dans le processus de positionnement des centrosomes (Bisel et al., 2008). De fait, nous avons trouvé que la déplétion en septine 9 aboutissait à la fragmentation du Golgi et au positionnement anormal des centrosomes au dessus des noyaux. On peut émettre l'hypothèse que le maintien de l'état

fragmenté du Golgi induit par l'absence de septine 9 affecte le positionnement des centrosomes en modulant les microtubules.

Dans les cellules MDCK polarisées en culture sur un filtre les filaments de la septine 9<sub>i1</sub>, présentent une localisation basolatérale tandis que les septines mutées sur l'un ou les deux sites polybasiques présentent une localisation apicale. L'absence de l'interaction de la septine 9 mutée avec les phosphoinositides pourrait aboutir à perte de l'assemblage de la septine 9 et à la dissociation de cette protéine des membranes. En plus, ceci prorrail induire des changements dans l'organisation de Golgi et le positionnement des centrosomes. Ces effets pourraient affecter l'axe de la division et provoquer la formation des cystes avec multilumières comme l'on voit dans le cas des cellules MDCK exprimées des septines mutées en culture 3D.

L'ensemble de ces résultats indique un rôle essentiel de la septine 9 dans la régulation des compartiments membranaires intracellulaires et l'installation de la polarité cellulaire par son interaction avec les PIs via ses deux domaines polybasiques.

## **Septin 9 binds the phosphoinositides via two polybasic domains implicated in Golgi assembly and apico-basal polarity**

Mohyeddine Omrane<sup>1,2</sup>, Juan Peng,<sup>1,2</sup> Cyntia Taveneau<sup>3</sup>, Thibault Tubiana<sup>3</sup>, Jinchao Yua<sup>3,4</sup>, Raphaël Guérois<sup>3,4</sup>, Didier Samuel<sup>1,2</sup>, Bruno Goud<sup>5</sup>, Christian Poüs<sup>1,2</sup>, Stéphane Bressanelli<sup>3</sup>, Ama Gassama-Diagne<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> INSERM, Unité 1193, Villejuif, F-94800, France

<sup>2</sup> Univ Paris-Sud, UMR-S 1193, Villejuif, F-94800, France

<sup>3</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif sur Yvette cedex, France

<sup>4</sup> Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France DRF/iBiTec-S/SB2SM/LBSR

<sup>5</sup> Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR 144, Paris, France

Correspondence should be addressed to [ama.gassama@inserm.fr](mailto:ama.gassama@inserm.fr)

## **INTRODUCTION**

Septins belong to a family of GTP-binding proteins that bind phosphoinositides (PIs) allowing their association with membranes<sup>1,2</sup>. Septins control many cellular functions such as cytokinesis, vesicle trafficking, and cell polarity<sup>3,4</sup> but several questions remain regarding the biological relevance of septin/PI interactions<sup>5</sup>. Septins bear a polybasic domain (PB1) at the N-terminus of their GTP-binding domain previously shown to be responsible for their interaction with PIs<sup>6,2,7</sup>. We recently reported that SEPT9 deletion of PB1 strongly decreases but not totally disrupted its binding to monophosphorylated PIs. Here, using homology modeling of septin 9 (SEPT9) oligomer, we reveal the presence of another polybasic domain (PB2) within the GTP-binding domain. Deletion of PB2 decreases SEPT9 binding to PIs and impairs septin filament formation similarly to deletion of PB1 and suppression of the two domains has a pronounced effect. We also show that both PB1 and PB2 are required for Golgi apparatus assembly and the nucleus/centrosomal positioning. Furthermore we show that SEPT9 is located at the basolateral membrane of polarized MDCK cells and deletion of PB1 or PB2 induces its localization at apical membrane and the formation of cysts with multilumen phenotype.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The alignment of SEPT9 sequence with those of other septins revealed a second motif enriched in basic amino acids (aa399-402 of human SEPT9 (isoform\_i1, 586 residues)) that we named polybasic domain 2 (PB2) (Fig.1a). PB2 contains a variable number of basic aminoacids (2 to 4) but its presence is conserved in all human septins (Fig.1a). To get more insight into the potential relevance of PB2 in SEPT9 structural organization and in putative binding to PIs, we performed homology modelling to build 3D structure model of SEPT9. Indeed in mammals, 14 septins have been identified and are classified into four groups

(septin 2, septin 3, septin 6 and septin 7 group)<sup>8</sup> (Fig.1,a). Septins form hetero-oligomeric complexes composed of hexameric subunits in the following arrangement: (7+6.2+2.6+7)<sup>9</sup>, where '+' denotes an interface involving the N- and C-termini (NC interface) and '.' denotes an interface involving the nucleotide-binding sites (G interface). SEPT9 can assemble onto the extremities of the hexamer, thereby generating an octamer (9.7+6.2+2.6+7.9)<sup>10</sup> involved in the formation of higher order structures, including filaments and rings. SEPT9 belongs to the septin 3 group of septins<sup>11</sup> for which only one crystal structure is available<sup>12</sup>. The crystallized construct comprises residues 59-350 of human neuronal-specific septin 3 in complex with GDP. We extensively rebuilt and refined the available structure to have a template as complete and accurate as possible for our modeling (see methods). The ordered part of this construct harbours a 75% sequence identity with residues 297-565 of human SEPT9 (isoform\_i1, 586 residues). It starts right after PB1 (<sup>289</sup>RRKAMK<sup>294</sup>) and comprises PB2 (<sup>399</sup>RKKR<sup>402</sup>). The septin 3 construct crystallized as a filament with molecules associated not only by their G interfaces but also by their NC interfaces. Thus we could use homology modeling to model the G and NC interfaces for SEPT9 (Fig. 1b). Subsequently we added PB1 using an *ab initio* approach (see methods). PB1 and PB2 from a single SEPT9 molecule are juxtaposed on one side of the NC interface (Fig. 1c). Indeed, as remarked by Macedo et al. for septin 3<sup>12</sup>, PB2 is prominently involved in the NC interface, making numerous salt bridges with the next molecule in the filament through R<sup>399</sup>, K<sup>401</sup> and R<sup>402</sup> (Fig. 1c). Thus PB1 and PB2 form an extended basic cluster on the side of each SEPT9 molecule and this cluster is in part engaged in the NC interface of the filament.

Then we used the PPM server<sup>13</sup> to determine the spatial position of a SEPT9-containing filament with respect to a lipid bilayer. We found that a 4-molecule SEPT9 complex (one NC interface, Fig. 1d) consistently orients with the PB1-PB2 cluster of one molecule of the

central NC interface in direct contact with the membrane (Fig. 1d, 1e). Of note, the same regions of the other molecules are displayed on the other face of the two fold-symmetric NC interface. When a PC-PE membrane containing PtdIns5P, PtdIns5P and PtdIns5P was explicitly modelled with the SEPT9 tetramer, the membrane-proximal PB1-PB2 cluster, particularly R<sup>289</sup>, R<sup>290</sup>, K<sup>291</sup> and K<sup>400</sup>, were positioned to interact with the lipid polar headgroups, particularly the phosphates of the phosphoinositides (Fig. 1f). Overall, these data suggest that the PB2 domain contributes, together with PB1, in SEPT9 interaction with membranes by increasing the basic patch of PB1 and indirectly by contributing to the septin 9 NC interface that is expected to be formed in higher order structures.

To verify the functional relevance of SEPT9\_i1 PB2, we generated a PB2-deleted mutant (SEPT9\_del2) and another mutant deleted of both PB1 and PB2 (SEPT9\_del1,2) (Fig. S1,a). Recombinant SEPT9\_i1 binding to PtdInsmonophosphates was strongly reduced with SEPT9\_del1 (as shown recently in ref) or with SEPT9\_del2, while the deletion of both PB domains (SEPT9\_del1,2) almost completely abolished lipid binding (Fig. S1,b). In line with our above modelling (Fig. 1), this result confirms that PB2 is also implicated in SEPT9/Pis interaction. In addition, immunofluorescence analysis revealed that unlike SEPT9\_i1, the SEPT9 mutants failed to be incorporated into filaments indicating that like for PB1(ref), PB2 is also involved in septin filaments formation (Fig. S1c).

PtdIns(3)P, PtdIns(4)P and PtdIns(5)P are detected primarily in endomembrane compartments<sup>14,15</sup> thus we sought to determine the roles of PB1 and PB2 in the morphology the endoplasmic reticulum (ER), the Golgi apparatus and the multivesicular bodies (MVB)<sup>15</sup>. HeLa cells expressing wild-type or PB-deleted SEPT9\_i1 (Fig.S1,a) were stained using anti-calnexin for the ER, anti-Lamp1 for MVBs (Fig.S2) and anti-GM130 for the Golgi apparatus (Fig2.a). No visible change in organelle distribution was observed in cells overexpressing a V5-tagged

SEPT9\_i1 vector compared to the empty vector (EV) (Fig.S2 and Fig. 2a). In contrast, the deletion of PB1, PB2 or of both domains perturbed peripheral ER extension and MVB scattering (Fig. S2). PB-deleted SEPT9\_i1 also dramatically affected Golgi compaction as they increased the number of Golgi elements with a smaller size (Fig. 2,a-d).

The mammalian Golgi is organized into stacks of flattened cisternae, adjacent to the centrosome during the interphase and undergoes extensive fragmentation and scattering during mitosis prior to reassembly during the telophase, in a MT-dependent manner<sup>16</sup>. To gain dynamic insight into the role of SEPT9/PIs interaction in Golgi reassembly, we have performed a nocodazole washout assay in stably-transfected MDCK cell lines, which displayed the same phenotypes at steady-state (Fig S3) than those found in HeLa cells (Fig. 3a). Extensive microtubule depolymerization by nocodazole resulted in the dispersal of Golgi elements throughout the cytoplasm, then nocodazole removal allowed microtubule repolymerization and subsequent re-clustering of the Golgi elements (Fig. 3e). This re-clustering is a two-step process involving Golgi-based microtubule nucleation<sup>17</sup>, local clustering of neighbouring Golgi elements and then central compaction along centrosomal microtubules<sup>16</sup>. As shown in Fig. 2e, the scattered Golgi elements normally reassembled in EV and SEPT9\_i1 cells as indicated by the increase of the Golgi stacks size, while clustering was dramatically inhibited in SEPT9 del1.2 cells during the first 20 min of the washout experiments (Fig.2 e) and up to 60 minutes after nocodazole removal (Fig. S4). Additionally, the SEPT9-i1 colocalization with microtubules, which is expected to occur at all the stages of the washout through the N-terminal basic region of long SEPT9 isoforms<sup>18</sup>, is lost when a PB domain is deleted (Fig. S4), indicating the role of SEPT9 and of its PB domain(s) in microtubule-dependent Golgi reassembly.

As there is a possibility that overexpressed SEPT9 may assemble into filaments that are

distinct from endogenous septin filaments, we also studied the consequences of endogenous SEPT9 depletion on Golgi morphology using 3D reconstruction and the stack radial profile (Fig. 3, a). Consistent with the PB deletion results, SEPT9 RNAi caused a significant decrease in Golgi compactness index and increase in Golgi element number and size in the majority of cells (Fig. 3,b-e). Furthermore, a nocodazole washout assay using HeLa cells stably depleted of SEPT9 (Fig3.f) showed that again, Golgi reassembly was impaired in SEPT9-depleted cells as observed for SEPT9<sub>del1.2</sub> cells. Additionally, SEPT9 depletion caused a decrease in the number and length of microtubules nucleated by Golgi elements and by centrosomes at early time points during recovery from nocodazole treatment (Fig3.f). This could result in defective interaction of Golgi elements with centrosomal microtubules and could explain the fragmented Golgi phenotype observed at steady state (Fig. 3g). Finally, it appears that SEPT9 also regulates centrosome asymmetric positioning, as its depletion increased the proportion of cells with  $\alpha$ -tubulin staining centred over nuclei (Fig. 3h). Consistent with this loss of asymmetry of the centrosome-Golgi nexus in cells depleted of SEPT9<sub>i1</sub>, tubulin acetylation, which is highly associated with Golgi membranes<sup>17</sup>, also displayed a loss of symmetry (Fig. S5).

The morphology and positioning of the organelles such as the Golgi apparatus need to be tightly regulated to ensure proper vesicle trafficking required for cell homeostasis<sup>22,23,24</sup>. Furthermore vesicle trafficking as well as the Golgi and centrosome positioning are key events required for cell polarization<sup>25,26</sup>. However the role of SEPT9 in vesicle trafficking and cell polarity was not fully investigated and the importance of SEPT9 interaction with PI in the polarization process remains elusive.

First we investigated the role of SEPT9 on the secretory pathway using a, venus tagged Neuropeptide Y construct (NPY-venus) as a model of secreted protein. The cDNAs of either

SEPT9\_i1 or those of the different mutants were co-transfected with NPY-venus cDNA in HeLa cells and were analyzed either by immunofluorescence staining or immunoblot of the culture media and lysates. As expected, SEPT9 mutation resulted in Golgi fragmentation and this was associated with a decrease of the NPY-venus level in the culture medium compared to SEPT9\_i1 cells (Fig.S6a) indicating the implication of septin PB domains in NPY-venus secretion. Also, along with Golgi fragmentation, depletion of SEPT9 resulted in a significant decrease of NPY-venus secretion confirming the involvement of SEPT9 in exocytosis (Fig.S6b).

Next we studied the role of SEPT9 /PI interactions in apico-basal polarity using MDCK cells, a well-established model system. Serial optical slicing through the apico-basal axis of MDCK cells showed that the overexpression of SEPT9\_i1 does not alter monolayer formation (as seen by  $\beta$ -catenin labelling) and that SEPT9\_i1 was incorporated into filaments mostly localized at the basolateral membrane (BM). In contrast, SEPT9\_del1 and SEPT9\_del1,2 were delocalized to the apical domain (Fig. 4 and S7) in parallel to a decrease of lateral  $\beta$ -catenin signal (Fig.4a-b). These changes of localization were stronger when SEPT9 was deleted of its two PB domains (SEPT9\_del1,2) (Fig. 4.a-c) suggesting that binding of SEPT9 to membranes is required to maintain both SEPT9 and  $\beta$ -catenin at the BM (Fig. 4b, S7a).

To provide further insights into the role of SEPT9 in epithelial polarization and morphogenesis, we studied cyst formation by MDCK cells cultured on matrigel for 4 days. In control cysts,  $\beta$ -catenin staining revealed a monolayer of polarized cells surrounding a single open central lumen as visualized by actin signal. SEPT9\_i1 was enriched in basolateral locations like in 2D culture system (Fig.4) while the expression of SEPT9\_del1 or SEPT9\_del1,2 led to their apical localization and to the formation of cysts with multiple lumen or even with no lumen at all (Fig.5 a-b). Like in 2D culture (Fig. 4 a-b), a total

disorganization of  $\beta$ -catenin localization was also observed (Fig.5,a). Further analysis of V5tag distribution radial profile also showed that SPET9\_i1 depleted of PBs are more abundant in the apical regions while SEPT9\_i1 was found in the basolateral areas (Fig5 c-d). Together these data indicate that the PB domains are important for SEPT9\_i1 filaments polarized localization which is important for effective establishment of apico-basal polarity and lumen formation.

To conclude we reported here for the first time the presence of a second polybasic domain (PB2) in SEPT9, which is conserved among different human septins. In addition we showed that PB2 regulates SEPT9 binding to PI and its assembly in filament as reported for PB1 (paper in revision) and in line with literature data <sup>2,6</sup>. Of interest modelling septin 9 gives a molecular view of how septin 9 may connect septin 9.7+6.2+2.6+7.9 hetero-octamers through its NC interface during filament formation and how these molecular filaments may bind PI containing membranes through PB1 and PB2 on the side of this NC interface. Thus we provide a tentative mechanism to connect the formation of SEPT9 filaments to their association with membranes, which still remains an unanswered question.

Our results also revealed the role of SEPT9 in the regulation the morphology of the Golgi apparatus. *In vivo*, septins are accumulated in reversed topology beneath specific plasma membrane ingressions or concavities, such as cleavage furrows <sup>27</sup>. The topology of the membrane is stabilized by the septin as previously reported <sup>1</sup>. Thus we can speculate that SEPT9 could bind to PtdIns4P, its lipid partner enriched in the membranes of Golgi stacks to stabilize their topology and allow their assembly and anchoring to microtubules. Additionally, SEPT9 regulates the centrosome positioning and participates in the establishment of cell polarity and lumen formation.

Overall our data brought new insight in the importance of the interaction of SEPT9 with PI

for crucial biological processes such as Golgi assembly, intracellular trafficking and cell polarity. Importantly our data determined the subcellular localization of SEPT9 in polarized epithelial cells and the regulatory role of its interaction with PIs. These findings could be extended to the different septins due to their conserved sequence and thus offer new paradigm for the structural and biological features of septins.

## **Methods**

### **Cell Lines and Culture Conditions**

SEPT9 HeLa SilenciX (Sept9siRNA and control cell lines) was purchased from Tibo-bio lab. HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen) containing 4.5 g/l glucose and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids (GibcoBRL) and 1% penicillin/streptomycin (GibcoBRL). HeLa cells cDNA transfection were performed using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) according to manufacturer recommendations.

MDCK (Madin Darby Canine Kidney) cells were maintained in minimal essential medium (MEM) containing Earle's balanced salt solution supplemented with 5% fetal bovine serum and 1% of Penicillin/Streptomycin solution (10000 U/ml/10000 µg/ml) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air. For 2D culture, about 200000 MDCK cells were seeded on 0.4-µm polycarbonate Transwell Filter (12-mm diameter, Corning) for 3 days to polarize. For 3D culture MDCK cells were trypsinized as 15000 single cells/ml in 2% Matrigel (BD), 500 µl of cells were plated in each well of 8-well Lab-Tek II chamber slides (Thermo Fisher Scientific) precovered with Matrigel and grown for 4 days until cysts with lumen formed as described previously<sup>28</sup>. For transfection, MDCK cells seeded at low density (1x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>) were transfected with 1 µg cDNA using jetPRIME™ (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. For 3D culture, 24 h after transfection, cells were detached with trypsin and plated on Matrigel for 4 days as indicated above.

### **Plasmids, Antibodies**

pcDNA SEPT9\_i1 vector was a gift from Dr Russell (CCRCB, Queens University Belfast). KDE-GFP (Dipeptidyl peptidase IV in which the extracellular domain was replaced

by the GFP sequence to restrict the protein localization to Golgi apparatus for that we have used it for Golgi staining in life imaging experiments) was a gift from Pr Christian Poüs (Paris sud university-France). NPY-Venus was a gift from Pr Bruno Goud Institut Curie, PSL Research University.

Rabbit anti  $\alpha$  tubulin, mouse anti  $\alpha$  acetylated tubulin, mouse anti giantin, mouse anti lamp-1, mouse and rabbit anti V5 tag were purchased from Abcam; mouse anti GM130 from BD Transduction Laboratories, sheep anti TGN46 Antibody from novus , mouse anti PtdIns(4)P from echelon.  $\beta$ catenin from santa cruz. Mouse anti  $\gamma$  tubulin from Sigma-Aldrich. Secondary antibodies: Alexa Fluor® 633, 546 and 488-conjugated were purchased from Life Technology, Hoechst was purchased from Molecular Probes. Nocodazole was purchased from Sigma-Aldrich.

### **Immunofluorescence staining:**

Cells were grown on coverslips, fixed for 15 min by paraformaldehyde 4% and permeabilized for 30 min with PFS Buffer (PBS+ containing saponin 0.025% m/v, gelatin 0.7%) at 37°C. Then cells were incubated with primary antibody for 2 hr and appropriate secondary antibodies for 90 min. Then coverslips were mounted using Prolong Gold (Invitrogen). For 3D culture, samples were incubated in primary antibodies at 4°C overnight, followed by incubation for 90 min at 37°C.

### **Images acquisition and analysis**

Images were acquired with a Leica TCS SP5 AOBS tandem confocal microscope. 3D images were performed with Icy bioimage analysis software (<http://icy.bioimageanalysis.org>).

To quantify intensities distribution corresponding to intracellular compartments : Confocal Z stack images were processed by ImageJ background subtraction tool. cell ROI was made by free hand selection tool and the intensities outside it were cleared then ImageJ Radial Profile Angle plug-in has been used to quantify the normalized intensities around concentric circles as a function of distance from a nuclei centre. The nuclei centre has been automatically defined using nuclei ROI.

Golgi stacks size : Images were processed by background subtraction and standardized thresholding, cell ROI was made by free hand selection tool, then LDs area and

number was obtained by ImageJ analyze particles function.

Golgi compactness which is dimensionless circularity of the Golgi apparatus was then computed according to the formula  $4 \cdot (\sum (\text{areas}) / (\sum (\text{perimeters}))^2)$  with a range of 1 (perfect compactness) to 0 (perfect fragmentation) <sup>29</sup>.

### **Immunoblot**

Cells were washed with ice cold Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) and lysed on ice in the following buffer: 20 mM Tris, HCl, 100mM NaCl, 1% Triton X100 and 10mM EDTA at PH 7.4 containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche). The proteins were separated by SDS-PAGE.

For NPY analysis in culture medium: 40µl of culture medium were separated by SDS-PAGE.

### **Nocodazole wash out assay**

cells were grown on 12-mm glass coverslips and allowed to attach overnight then were incubated with culture medium contained nocodazole (2.5µg/ml) for 1 hr at 37°C then for 2 hr on ice. Then cells were rinsed on ice five times with ice-cold medium to remove the nocodazole and then moved into new 12-well plates contained warm (37°C) medium (time 0) and incubated for indicated time at 37 °C prior to be fixed and stained. To detect the microtubules in the wash out experiments , soluble tubulin was eliminated first to reduce the background fluorescence. For this purpose, cells were permeabilized in MT-stabilizing buffer (80 mM Pipes, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, pH 6.9) containing 0.15% Triton X-100 (37°C, 1 min), and then twice with Triton-free buffer and twice with PBS at room temperature prior to be fixed by methanol at -20°C <sup>30</sup>.

### **Homology modeling**

#### **Septin 3 (59-350) structure rebuilding**

We carefully completed and rebuilt the S3 GTPase domain G dimer available (PDB code 3SOP) using Coot <sup>31</sup> and phenix.refine <sup>32</sup>. Beyond correction of a few local errors, we could reliably model all missing loops except the N-terminus of switch I (corresponding to S9 residues 323-333), and most missing sidechains. Sidechains for which no density was

apparent were still included in the most likely rotamer given chemical environment. The final structure comprises the counterparts of S9 residues 297-565 (less residues 323-333) and was refined to  $R_{\text{work}} = 0.2039$ ,  $R_{\text{free}} = 0.2612$  from initial values of  $R_{\text{work}} = 0.2585$ ,  $R_{\text{free}} = 0.2780$ .

### **Homology modeling of an S9 297-565 4-molecule filament with Rosetta**

An S3 4-molecule filament with a single NC interface was generated by crystallographic symmetry. The filament model of S9 297-565 was built using Rosetta3.5<sup>33</sup> with the following steps: 1) RosettaCM comparative modeling pipeline<sup>34</sup> was used for building a monomeric S9 model, taking an S3 monomer (residues 59-350) as template; 2) Rosetta relax protocol was first used for the NC interface refinement under C2 symmetry constraints, while the regions far away from the NC interface were kept fixed; 3) the G interface was refined in a similar way under C2 symmetry constraints, without moving the NC interface. Particularly, a dozen of distance constraints were carefully introduced in this step to preserve the nucleotide binding site as in GDP-bound state; 4) at last, GDP and Mg were copied into the monomeric model and the filament was built by symmetry.

### **Modeling of PB1 in the context of an S9 4-molecule filament and membrane orientation**

The threading server I-Tasser<sup>35</sup> was used to add S9 residues 288-296 (including PB1) to the 297-565 Rosetta model. Although two orientations of PB1 are possible in the context of an S9 monomer, only the conformation pointing away from the NC interface is consistent with filament formation across this interface. We introduced this conformation in the S9 tetrameric model. Orientation of this filament relative to a membrane was then computed using the energy transfer method implemented in the PPM server<sup>13</sup>.

### **PC-PE-PIP / SEPT9 membrane generation and optimization**

The position predicted by the PPM server was used as input to the CHARMM-GUI<sup>36</sup> to add a  $200 \times 200 \text{ \AA}^2$  lipid bilayer to the S9 tetramer. Lipid composition was chosen identical for both leaflets: 55% POPC, 25% POPE, 10% POPI5P, 5% POPI3P and 5% POPI4P. This protein-membrane system was energy-minimized, equilibrated and subjected to a 10-ns molecular dynamics simulation using GROMACS<sup>37</sup> and the CHARMM36 force field update for lipids. We used the GROMACS protocols encoded in the scripts generated by the CHARMM-GUI to perform the simulation<sup>38</sup>.

## Statistical analyses

Unpaired Student's t tests was used and statistical significance was determined at \*P <0.05; \*\* P <0.001, \*\*\*P < 0.0001.

## References:

1. Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M. & Takiguchi, K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol. CB19*, 140–145 (2009).
2. Zhang, J. *et al.* Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol. CB9*, 1458–1467 (1999).
3. Dolat, L., Hu, Q. & Spiliotis, E. T. Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biol. Chem.***395**, 123–141 (2014).
4. Fung, K. Y. Y., Dai, L. & Trimble, W. S. Cell and molecular biology of septins. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.***310**, 289–339 (2014).
5. Weirich, C. S., Erzberger, J. P. & Barral, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***9**, 478–489 (2008).
6. Casamayor, A. & Snyder, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol. Cell. Biol.***23**, 2762–2777 (2003).
7. Pan, F., Malmberg, R. L. & Momany, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.***7**, 103 (2007).
8. Nakahira, M. *et al.* A Draft of the Human Septin Interactome. *PLoS ONE***5**, (2010).
9. Sirajuddin, M. *et al.* Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature***449**, 311–315 (2007).
10. Kim, M. S., Froese, C. D., Estey, M. P. & Trimble, W. S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.***195**, 815–826 (2011).
11. Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***13**, 183–194 (2012).
12. Macedo, J. N. A. *et al.* The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. *Biochem. J.***450**, 95–105 (2013).
13. Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I. & Lomize, A. L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.***40**, D370–D376 (2012).
14. Pendaries, C. *et al.* Emerging roles of phosphatidylinositol monophosphates in cellular signaling and trafficking. *Adv. Enzyme Regul.***45**, 201–214 (2005).
15. Kutateladze, T. G. Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat. Chem. Biol.***6**, 507–513 (2010).
16. Miller, P. M. *et al.* Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat. Cell Biol.***11**, 1069–1080 (2009).
17. Chabin-Brion, K. *et al.* The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell***12**, 2047–2060 (2001).
18. Bai, X. *et al.* Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J. Cell Biol.***203**, 895–905 (2013).
19. Rios, R. M. The centrosome–Golgi apparatus nexus. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.***369**, (2014).

20. POOLE, C. A., ZHANG, Z.-J. & ROSS, J. M. The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J. Anat.***199**, 393–405 (2001).
21. Sandoval, I. V., Bonifacino, J. S., Klausner, R. D., Henkart, M. & Wehland, J. Role of microtubules in the organization and localization of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.***99**, 113s–118s (1984).
22. Joshi, G., Bekier, M. E. & Wang, Y. Golgi fragmentation in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.***9**, (2015).
23. Xiang, Y. *et al.* Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. *Nat. Commun.***4**, 1659 (2013).
24. Lavieu, G. *et al.* The Golgi ribbon structure facilitates anterograde transport of large cargoes. *Mol. Biol. Cell***25**, 3028–3036 (2014).
25. Valenzuela, J. I. & Perez, F. Diversifying the secretory routes in neurons. *Front. Neurosci.***9**, (2015).
26. Sanders, A. A. W. M. & Kaverina, I. Nucleation and Dynamics of Golgi-derived Microtubules. *Front. Neurosci.***9**, (2015).
27. Spiliotis, E. T. & Nelson, W. J. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J. Cell Sci.***119**, 4–10 (2006).
28. Knight, Z. A. *et al.* A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell***125**, 733–747 (2006).
29. Bard, F., Mazelin, L., Péchoux-Longin, C., Malhotra, V. & Jurdic, P. Src Regulates Golgi Structure and KDEL Receptor-dependent Retrograde Transport to the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.***278**, 46601–46606 (2003).
30. Poüs, C. *et al.* Functional Specialization of Stable and Dynamic Microtubules in Protein Traffic in WIF-B Cells. *J. Cell Biol.***142**, 153–165 (1998).
31. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.***66**, 486–501 (2010).
32. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.***66**, 213–221 (2010).
33. Das, R. & Baker, D. Macromolecular modeling with rosetta. *Annu. Rev. Biochem.***77**, 363–382 (2008).
34. Song, Y. *et al.* High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Struct. Lond. Engl.* **199321**, 1735–1742 (2013).
35. Yang, J. *et al.* The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods***12**, 7–8 (2015).
36. Wu, E. L. *et al.* CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *J. Comput. Chem.***35**, 1997–2004 (2014).
37. Berendsen, H., Vandespoel, D. & Vandrunen, R. Gromacs - a Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation. *Comput. Phys. Commun.***91**, 43–56 (1995).
38. Lee, J. *et al.* CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.***12**, 405–413 (2016).

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC/SUBV/CKLQ6) to AGD and supported by ANRS (France REcherche Nord & sud SIDA - hiv Hépatites : FRENSH) through a grant to SB and a predoctoral fellowship to CT. We thank H.Russell (Queen University, Belfast, UK.) for providing SEPT9\_i1 construct. We also thank A.Baillet and C. Poüs (University Paris-Sud, UMR-S 1193, Villejuif, France) for live cell imaging facilities.

## Figure legends:

### Figure. 1: SEPT9 binds PIs by two polybasic domain

a. Multiple alignment of human septins in the polybasic domain (PB1), G-binding domain motifs G1, G2, G4 and septin motif 1. Polybasic domain 2 is boxed in red. Human septins subgroup were distinguished in deferent background color (sepin 6 subgroup in gray, septin 3 subgroup in green, septin 7 in yellow and septin 2 subgroup in cyan.

b. SEPT9 structure model shows PB1 and PB2 of the molecule in cyan.

c. PB1 and PB2 zoomed area .

d-e. SEPT9 polymer interaction with PIs containing lipid bilayer dot rectangle indicates PB1 and PB2 area.

f. Basic amino acids engaged in septin/Pis interaction.

### Figure. 2: SEPT9/ PIs interaction is required for Golgi assembly

a. HeLa cells were transfected with either EV, SEPT9\_i1, SEPT9\_del1, SEPT9\_del2, SEPT9\_del1.2 for 48h prior to be fixed and stained for GM130 (red) and V5tag (green).

b.c.d. Bar graphs present Golgi compactness index, Golgi stacks average size ,average Golgi stacks numbers, respectively, from experiments done as described in b. Shown data are mean  $\pm$  SEM from 15 cells.

e.Video frames illustrating assembly of the Golgi stained by KDE-GFP in MDCK stably transfected EV, sept9V5tag and sept9 $\Delta$ 1.2 after nocodazole washout .

Line graph presents Golgi stacks average size analysis based on live cell imaging upon the nocodazole washout. Average fold size increase of Golgi particles relative to time 0

(nocodazole removal) is shown from three cells.

**Figure. 3: SEPT9 depletion leads to Golgi fragmentation and affect centrosomes positioning**

a. SEPT9 siRNA and control cells were grown on cover slips for 24h prior to fixing and staining for giantin. Cells were shown in 2D images with black background and in 3D reconstruction images with white background. Scale bar 10 $\mu$ m.

b. Bar graph presents the percentage of cells with fragmented Golgi in SEPT9 siRNA and control cell lines. Confocal images from three independent experiments as described in c was used. At least 800 cells were counted for each cell line.

c.d.e Bar graphs presents Golgi compactness index, Golgi stacks average size, average Golgi stacks numbers, respectively, from 150 cells of three independent experiments done as described in b.

f. Nocodazole wash out assay: Sept9siRNA and control cells were incubated with nocodazole prior to be washed with ice cold culture medium to remove the nocodazole then incubated with prewarmed medium (37°C) for the indicated time. Then cells were extracted, fixed and stained for  $\alpha$ tubulin (green) GM130 (red). Line graph presents average microtubules fluorescence intensities in Golgi area of 10 cells treated as described above. Line graph presents average Golgi stack number in 30 cells treated as described above. Line graph presents average Golgi compactness in 30 cells treated as described above.

g. Model illustrate Golgi microtubules-dependant assembly in the control and septin depleted cells: control: centrosomes originated microtubules are used to transport Golgi stacks towards the centrosomes to reassemble; septin absence affect the centrosome originated microtubules and decreases its anchoring to Golgi stacks which lead to Golgi stacks assembly around the nucleus.

h. Control and Sept9 siRNA cells were stained for  $\gamma$ tubulin (green), TGN46 (red). Cells were shown in 2D images with black background and in 3D reconstruction images with white background. Centrosomes position was illustrated with the XZ images shown to right. Scale bar 10 $\mu$ m. Bar graph presents percentage of cells with over nuclei positioned centrosomes in confocal images from two independent experiments n=700 cells.

Data are means  $\pm$ SEM, Student's t-test was used \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001.

**Figure 4: Abolished SEPT9/PIs interaction change the cellular localization of SEPT9 and affects  $\beta$ catenin distribution at zonula adherens in MDCK cell polarity**

a. MDCK cells were transfected with SEPT9\_i1, \_del1, \_del1.2 or empty vector for 24 h then grown on transwell filters for 4 days. Cells were fixed and stained for V5 tag (green) and  $\beta$ catenin (red) as indicated on the pictures. Confocal images of vertical sections were presented upside. Single confocal sections through respectively the apical and basal of monolayer were shown in the middle. At bottom of each column, the fluorescence of V5 tag (green) and  $\beta$ catenin (red) signal were scanned along the pink line draw at random position. Arrowheads indicate the Zonula adherens. The scale bar represents 10  $\mu$ m.

b. Bar graph presents mean fluorescence intensity analysis of  $\beta$ catenin in Zonula adherens. values are expressed as mean $\pm$ s.e.m. of 30 cells. \*\*\*P<0.0001 (Student's t-test).

c. Bar graphs present the percentage of V5tag intensity in the basolateral and apical zones. values are expressed as mean $\pm$ s.e.m. of 20 cells.\*\*\*P<0.0001 (Student's t-test).

**Figure 5: SEPT9/PIs interaction is required for polarity in MDCK cysts**

a. MDCK cells, transfected with SEPT9\_i1, SEPT9\_ del1, SEPT9\_del1.2 or empty vector for 24 h, were grown on Matrigel to form cysts and analyzed after 72 h of culture. Cells were stained for V5 tag (green),  $\beta$ -catenin (gray) and actin (red), a single confocal section through the middle of cyst is shown. The scale bar represents 10  $\mu$ m.

b. Graphs show the percentage of different phenotype found in X experimentes done as described in a.

c. The distribution of V5tag signal was analysed by ImageJ software in an individual cell from a cyst. A circle was defined at the periphery of each cell and the middle of basal membrane of the cell was defined as its center. the plugin produces a profile plot of normalized integrated intensities around concentric circles as a function of distance from the circle centre, The circles was divided in three bands (1, 2, 3) with equal radius. Cells indicated by dot line in panel a are presented here.

d. The total intensity in each band was calculated from 20 cells and is represented as a bar graph. values are expressed as mean $\pm$ s.e.m. \*\*P<0.001 \*\*\*P<0.0001 (Student's t-test).

**Supplementary figures legends:**

**Figure S1. SEPT9/PIs interaction disruption impair septins assembly**

- a. Multiple alignment of sepin9\_I1, sepin9\_del1, sepin9\_del2 and sepin9\_del1.2 at PB1, G1, G3, G4, PB2.
- b. PIP strip overlay assay of SEPT9\_i1 (I1), SEPT9\_del1 (del1), SEPT9\_del2 (del2) and SEPT9\_del1.2 (del1.2). LPA, lysophosphatidic acid, LPC, lysophosphocholine, PtdIns, phosphatidylinositol, PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P2, PtdIns(3,5)P2, PtdIns(4,5)P2, PtdIns(3,4,5)P3, PA, phosphatidic acid, PS, phosphatidylserine, PE, phosphatidylethanolamine, PC, phosphatidylcholine, S1P, sphingosine 1-phosphate.
- c. HeLa cells were transfected with either EV or SEPT9\_I1 or sepin9\_del1.2 for 48h prior to be fixing and staining for V5tag (green).

**Figure S2. SEPT9/PIs interaction is required for ER and MVB regulation**

- a. HeLa cells were transfected with either empty vector (EV), SEPT9\_i1 (I1), SEPT9\_del1 (Del1), SEPT9\_del2 (Del2), SEPT9\_del1.2 (Del1,2) for 48h prior to be fixed and stained for calnexin (red) and V5tag (green).
- b. HeLa cells were transfected with either (EV), SEPT9\_i1 (I1), SEPT9\_del1 (Del1), SEPT9\_del2 (Del2), SEPT9\_del1.2 (Del1,2) for 48h prior to be fixed and stained for lamp1 (red) and V5tag (green).

**Figure S3. Septin9/PIs interaction is required for Golgi assembly:**

- a. MDCK empty vector (EV), SEPT9\_i1 (I1), SEPT9\_del1.2 (Del1,2) stably transfected cells were grown for 24h prior to fixing and staining for V5 tag (red) and GM130 (green). Bar graph below show, Golgi stacks average size, average Golgi stacks numbers, Golgi compactness index of 15 cells from 2 independent experiments. values are expressed as mean±s.e.m. \*\*\*P<0.0001 (Student's t-test).

**Figure S4. Septin9/PIs interaction is required for Golgi assembly:**

- a. Nocodazole wash out assay: MDCK empty vector (EV), SEPT9\_i1 (I1), SEPT9\_del1.2 (Del1,2) stably transfected cells were transfected with KDE-GFP for 24h then incubated with culture medium containing nocodazole (2.5µg/ml) for 1 hr at 37°C then for 2 hr on ice. Then cells were rinsed on ice five times with ice-cold medium to remove the nocodazole and then moved to (37°C) medium (time 0) and incubated for indicated time at 37 °C prior to be fixed and stained for β-tubulin (red) and V5tag (gray).

- b. Line graph present Golgi stacks average size and average Golgi stacks numbers from 20 cells for each time points from two independent experiments. values are expressed as mean $\pm$ s.e.m. \*\*\* $P$ <0.0001 (Student's  $t$ -test).

**Figure S5. SEPT9 depletion abolishes acetylated tubulin filaments asymmetry**

- a. Control and SEPT9 siRNA cells were stained for acetylated tubulin (green), TGN46 (red). Cells were shown in 2D images with black background and in 3D reconstruction images with white background. Scale bar 10 $\mu$ m.
- b. Schematic representation illustrates the asymmetric distribution axis of the cell and (to right) the tow region where acetylated tubulin fluorescence intensity were measured.
- c. Angle radial profile blots of the tow cells presented in (b) of acetylated tubulin fluorescence intensity .
- d. Sector graphs shows acetylated tubulin fluorescence intensity distribution in the tow side of the asymmetric axis. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.0001 (Student's  $t$ -test).

**Figure S6. SEPT9/PIs interaction disruption or SEPT9 depletion affect NPY-venus secretion.**

- a. HeLa cells were co-transfected with NPY-venus and either empty vector (EV), SEPT9\_I1 (I1), SEPT9\_del1 (Del1), SEPT9\_del2 (Del2) or SEPT9\_del1.2 (Del1.2) for 24 h. prior to be either fixed and stained for V5tag red, giantin (cyan).
- b. HeLa cells were co-transfected with NPY-venus and either EV, SEPT9\_I1, SEPT9\_del1, SEPT9\_del2 or SEPT9\_del1.2 for 24 h. NPY- venus has been analyzed by western blot in the culture medium and in the cells lyses .
- c. Control and SEPT9 siRNA cells were transfected with NPY-venus and incubated with the same culture volume for 24h prior to fixing and staining for GM130 (Red).cells shown on 2D images with black background and in 3D reconstruction images with white background.
- d. Control and SEPT9 siRNA cells were transfected with NPY-venus and incubated with the same culture volume for 24h. NPY-venus has been analyzed by western blot in the culture medium and in the cellular lyses. Bar graph presents mean  $\pm$  sem from three independent experiments. \* $P$ <0.05, (Student's  $t$ -test).

**Figure S7. SEPT9/PIs interaction disruption change SEPT9 localization and  $\beta$ catenin distribution**

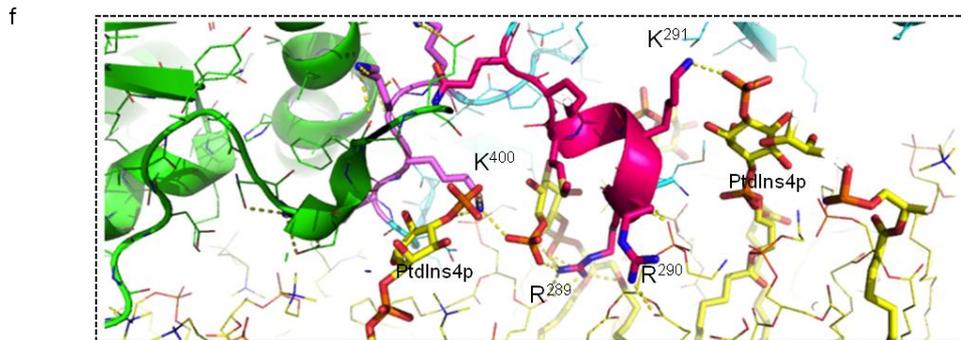
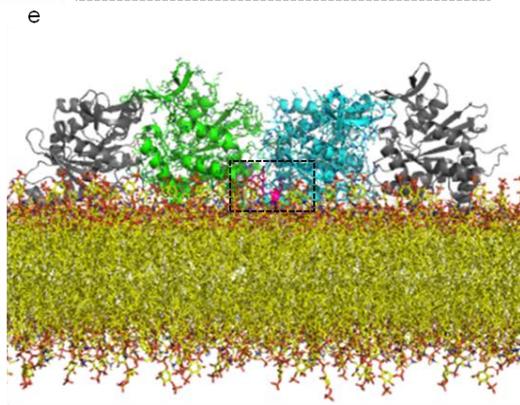
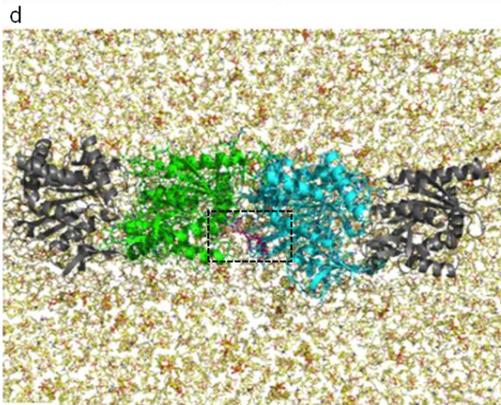
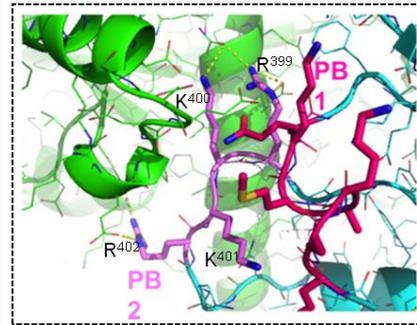
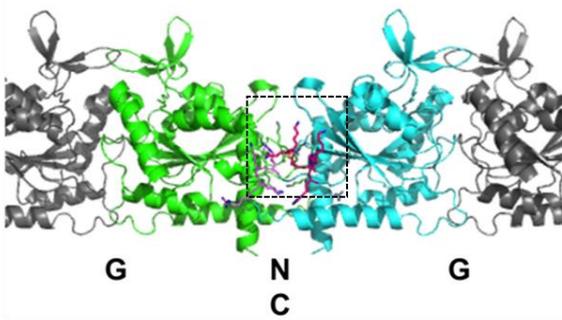
Z stack confocal images of MDCK cells transfected with SEPT9\_I1 (I1), SEPT9\_del1 (Del1), SEPT9\_del1.2 (Del1.2) or empty vector for 24 h then grown on transwell filters for 4 days. Cells were fixed and stained for  $\beta$ catenin (red) (a) and V5 tag (green) (b) and presented in figure 4,a.

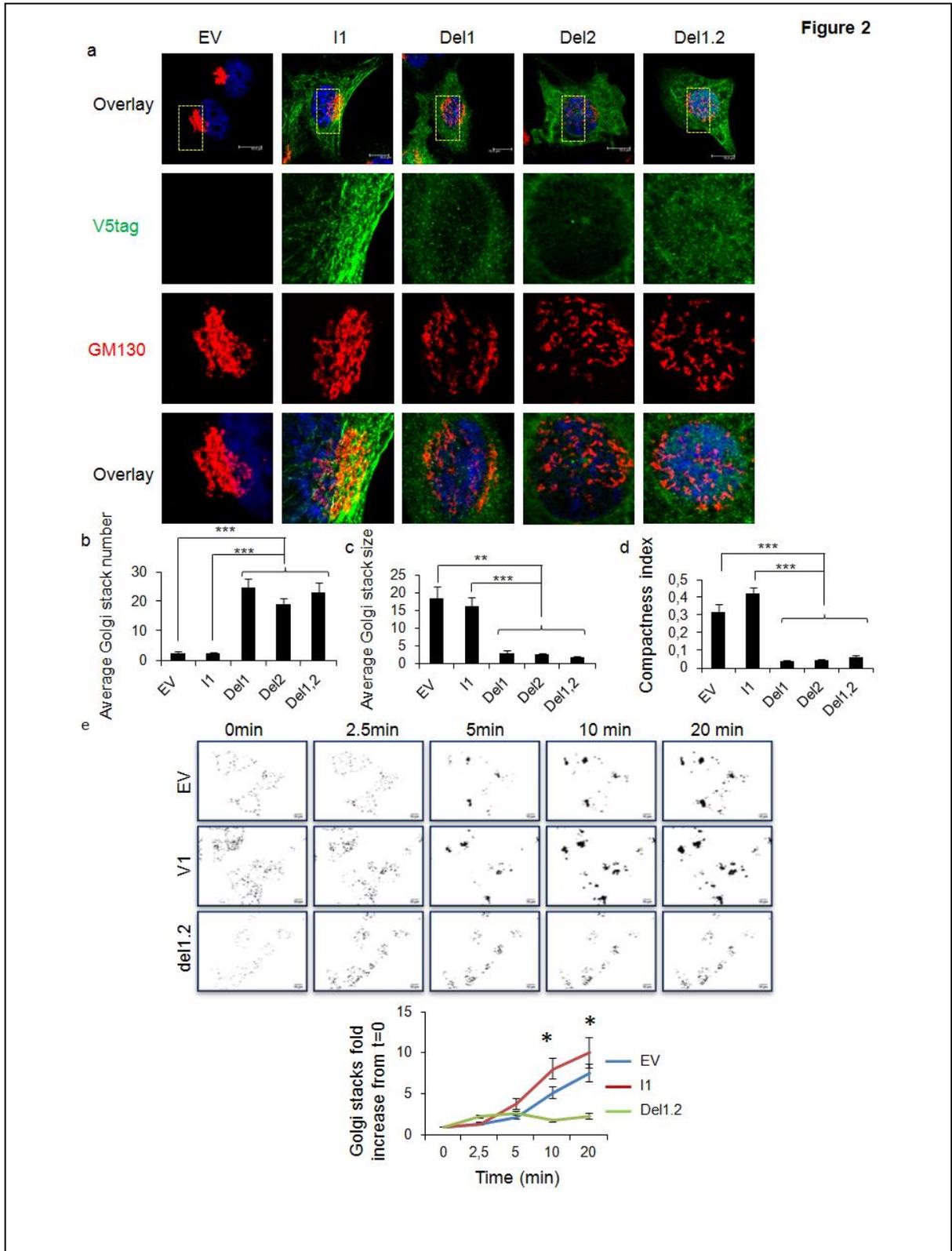
Figure 1

a.

			Polybasic domain 1	G1 motif	switch I	G3 motif	septin motif 1	G4 motif		
sp	Q6ZU15	SEPT14	HUMAN	VSRSIQ	GETGIGK	KDNK----	SSHFYSNVGL	ETVG	EIKIKRSLFF	AKAD
sp	Q9P0V9	SEPT10	HUMAN	VNSIQQ	GETGIGK	EDYE----	SSHFCPNVKL	NTVG	EIKIKRSLFT	AKAD
sp	Q92599	SEPT8	HUMAN	VSRSVTQ	GETGIGK	ETEE----	ASHHEACVRL	DAVG	EIKIKRSLFD	AKAD
sp	Q14141	SEPT6	HUMAN	VNSVSVQ	GETGLGK	EGEP----	ATHTQPGVQL	STVG	EIKIKRVLHT	AKAD
sp	Q9NVA2	SEPT11	HUMAN	VNSVSTQ	GETGIGK	ESDP----	ATHNEPGVRL	DTVG	EIKIKRSLFN	AKAD
sp	Q8IYMI	SEPT12	HUMAN	KIAMAM	GQSGLGK	WKS-NPPGLGVPTPOTLQL		DTPG	EILLITRQR	ARAD
sp	Q9UHD8	SEPT9	HUMAN	RRRAMKQ	GQSGLGK	SRKSVQPTSEEIPKTIETI		DTPG	EVNINRKK	AKAD
sp	Q9UH03	SEPT3	HUMAN	RKRMTMT	GQSGLGK	SRKASSWNREEKI	PKTVEI	DTPG	EVNIARKK	AKAD
sp	Q16181	SEPT7	HUMAN	YRRSVKK	GESGLGK	YSP-EYPGPSHRIKKTQV		DTPG	ESRVNR	AKAD
sp	Q15019	SEPT2	HUMAN	HRRSVKK	GESGLGK	YPERVIPGAAEKIERTVQI		DTPG	ESGLNR	AKAD
sp	Q8WYJ6	SEPT1	HUMAN	HRRSVKK	GESGLGK	YEDRQVPEASARLTQTLAI		DTPG	ESGLNR	GKAD
sp	Q99719	SEPT5	HUMAN	HRRSVKK	GESGLGK	YKDRKLLSAEERISQTVETI		DTPG	ESGLNR	AKAD
sp	O43236	SEPT4	HUMAN	HRRSVKK	GESGLGK	YRDRKLLGAEERIMQTVETI		DTPG	ESGLNR	AKAD
			::	:::***		::	::	::	::	::**

b. c. Polybasic domain 2





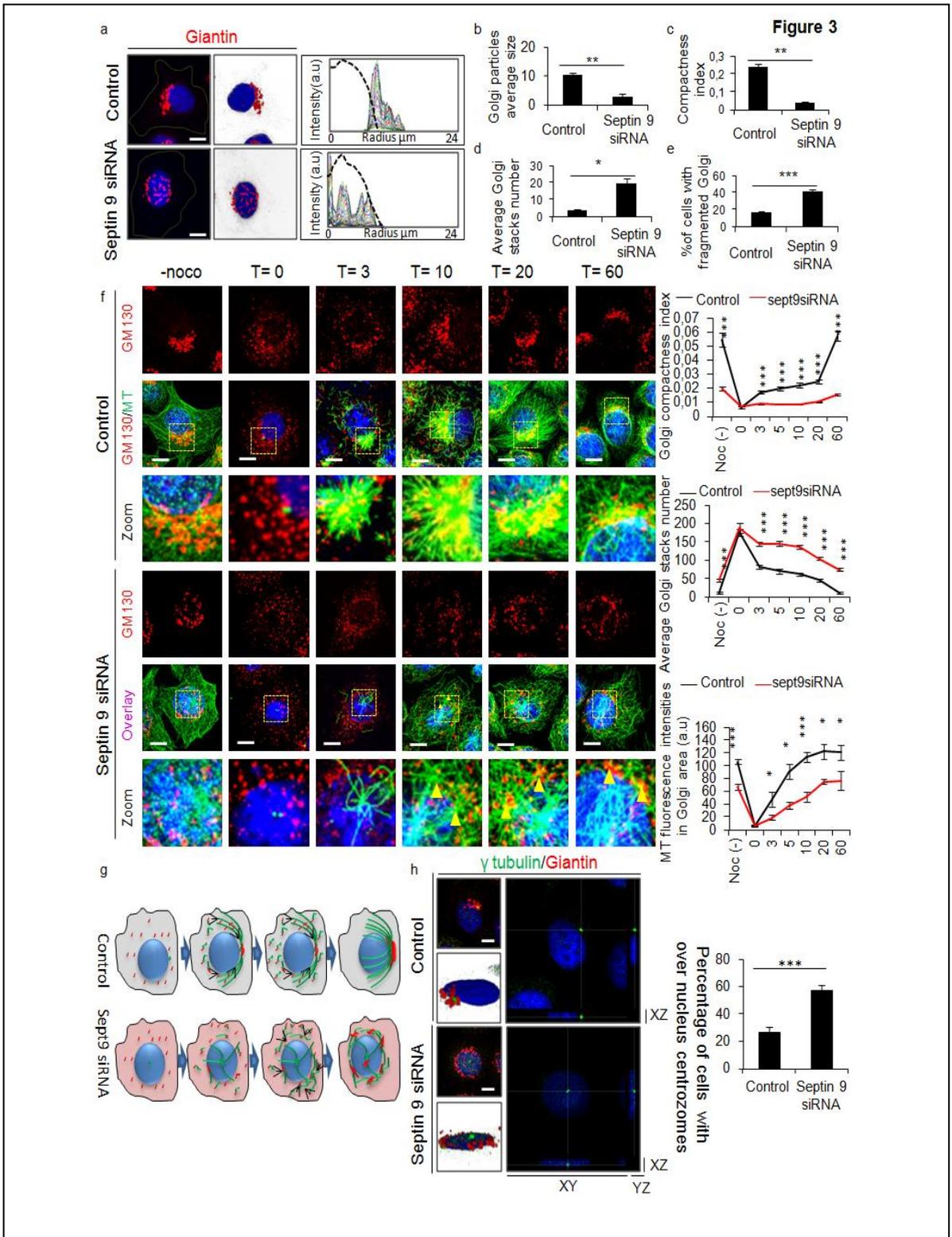


Figure 4

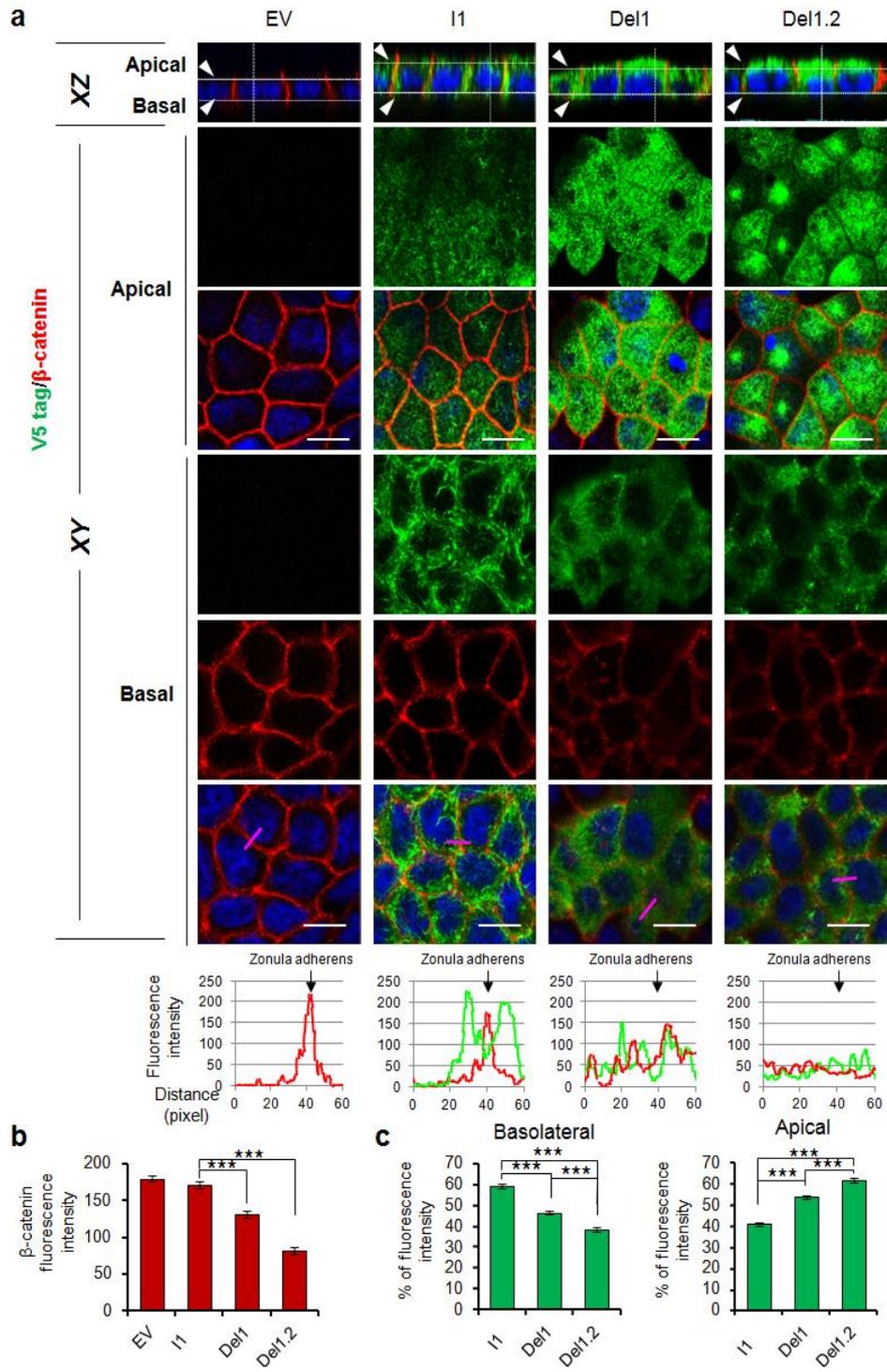


Figure 5

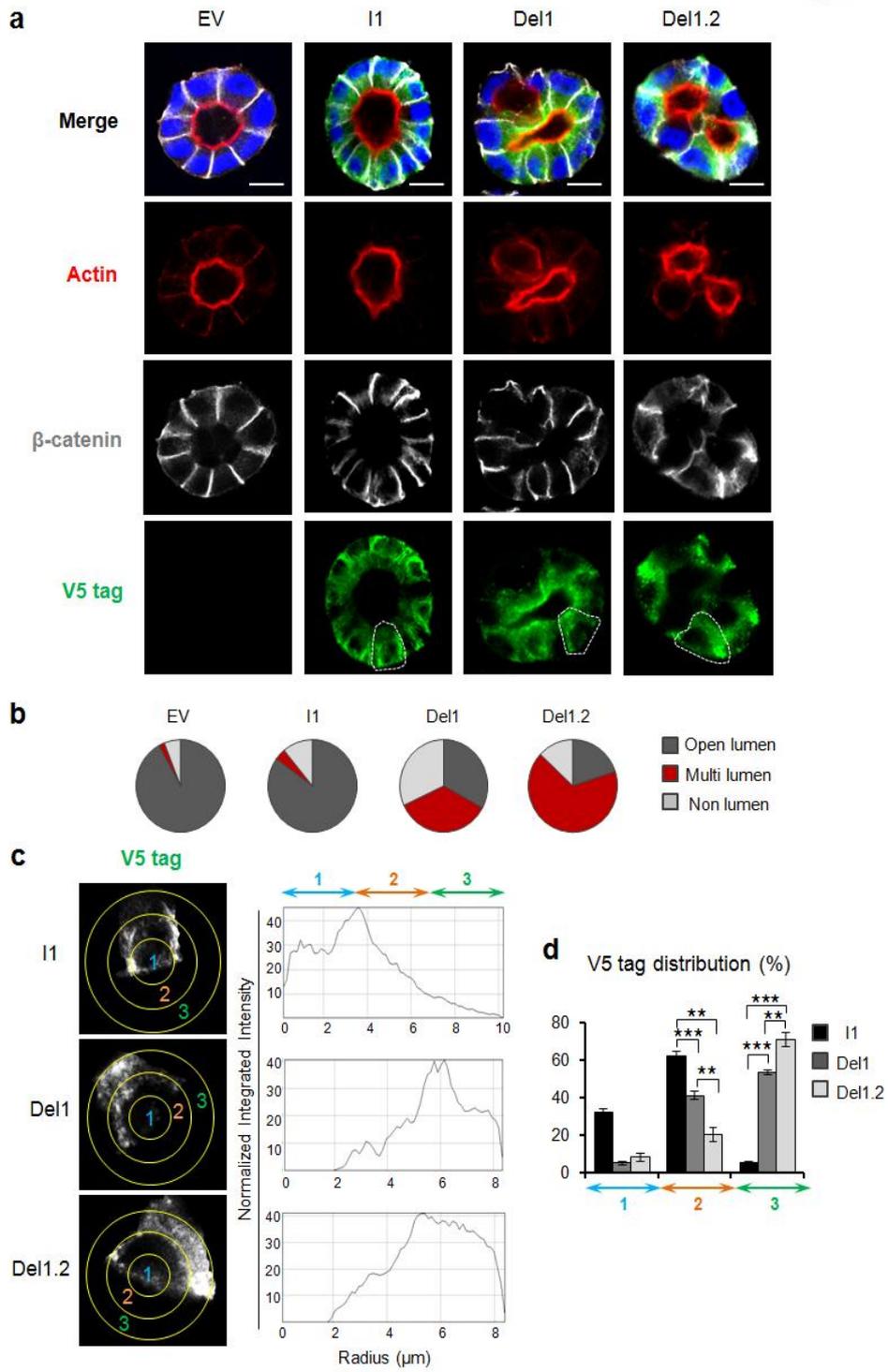
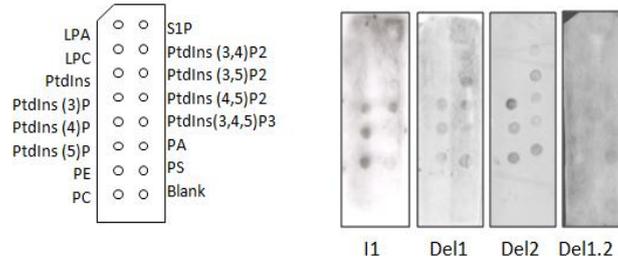


Figure S1

a.

	Polybasic	G1 motif	G3 motif	polybasic	G4 motif
domain 1		GXXXXGK	DXXG	domain 2	XKXD
259		305	311	362 365	399 402
septin9-wt	RRKAM	-GQSLGK	-DTPG	RRKR	AKAD
		305	311	362 365	399 402
septin9-Δ1		-GQSLGK	-DTPG	RRKR	AKAD
		305	311	362 365	399 402
septin9-Δ2	RRKAM	-GQSLGK	-DTPG		AKAD
		305	311	362 365	399 402
septin9-Δ1.2		-GQSLGK	-DTPG		AKAD
		305	311	362 365	399 402

b.



c.

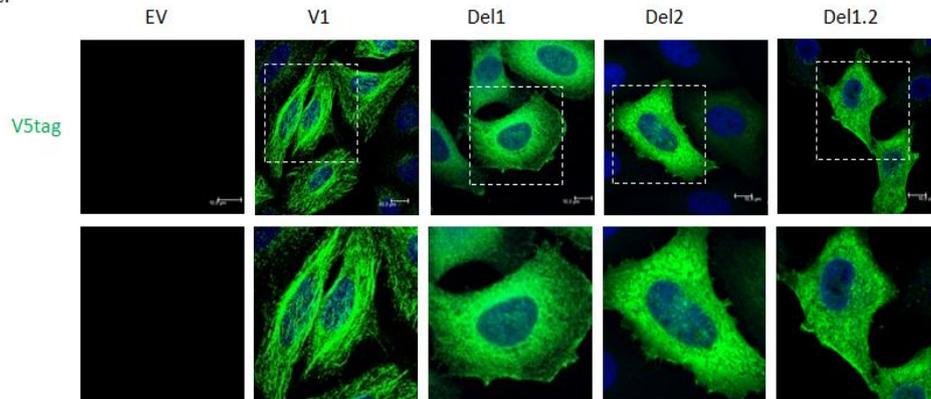


Figure S2

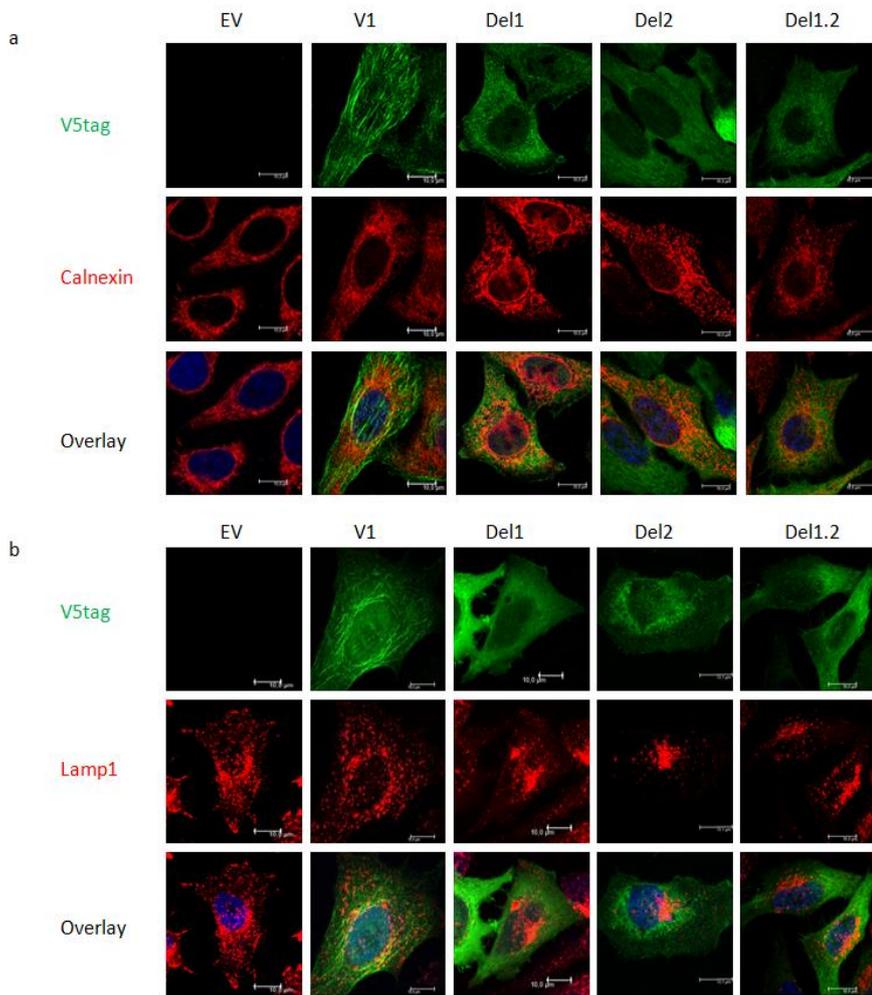
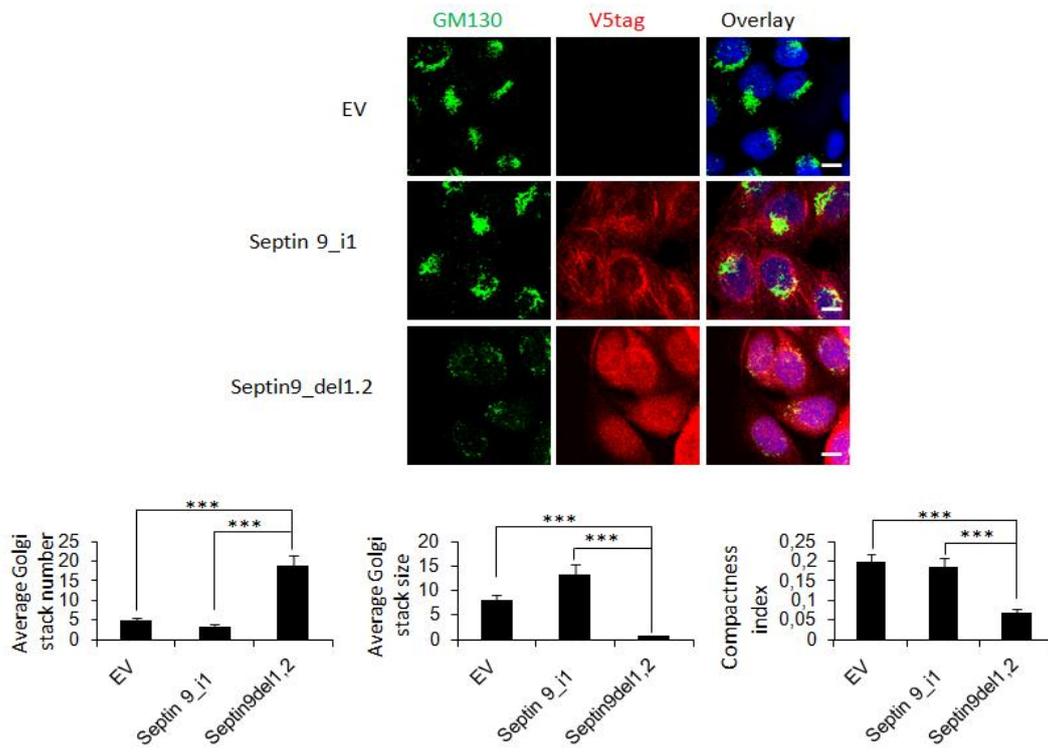


Figure S3



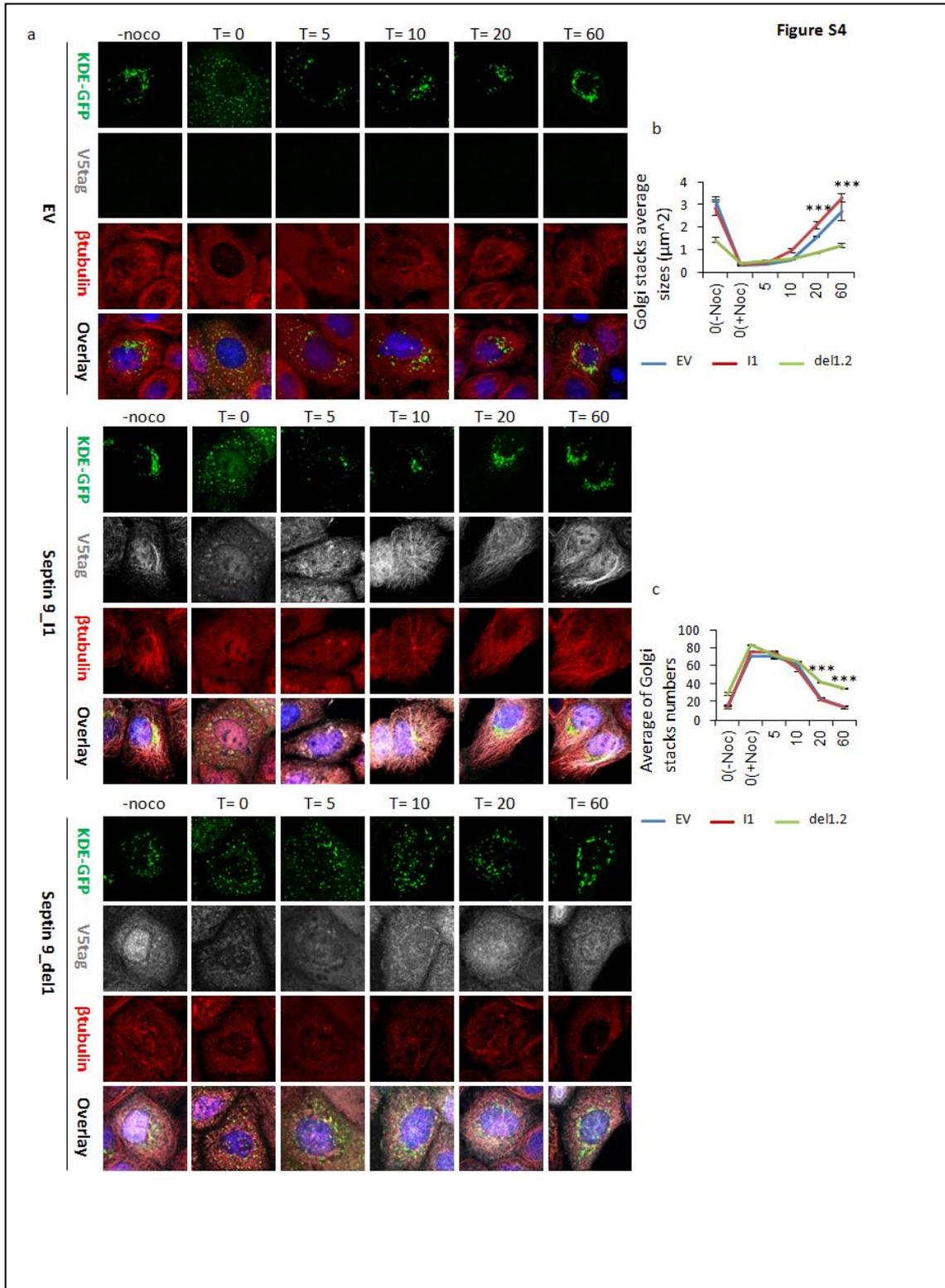


Figure S5

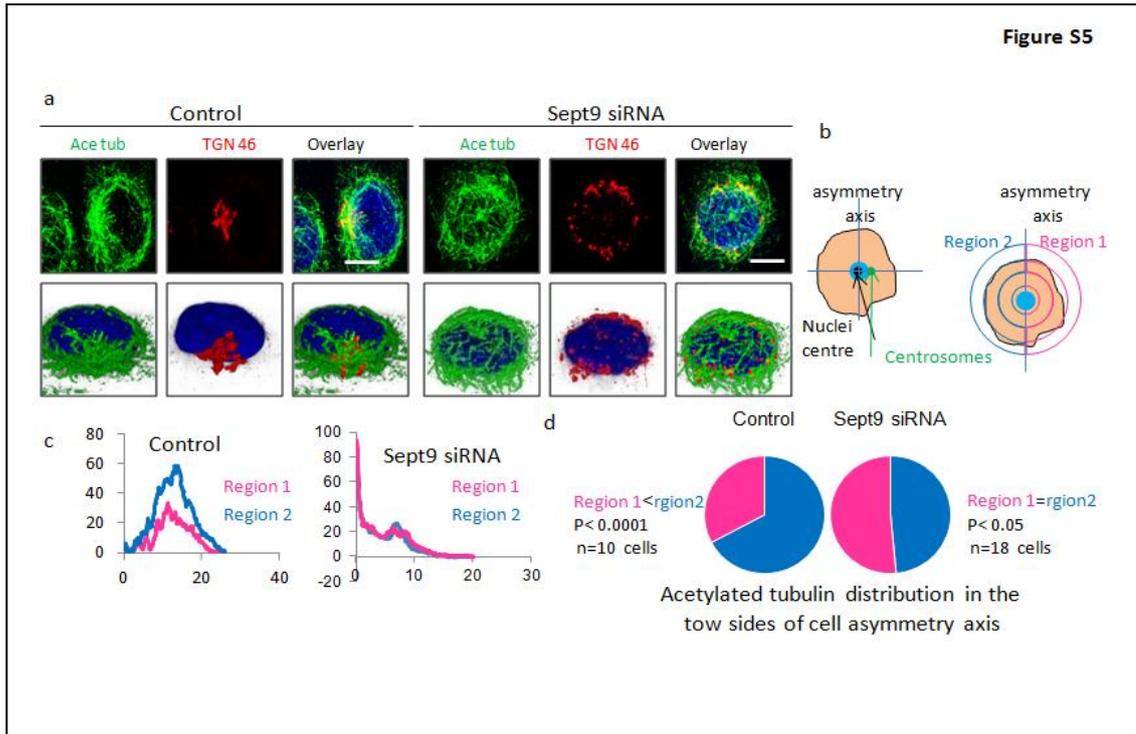


Figure S6

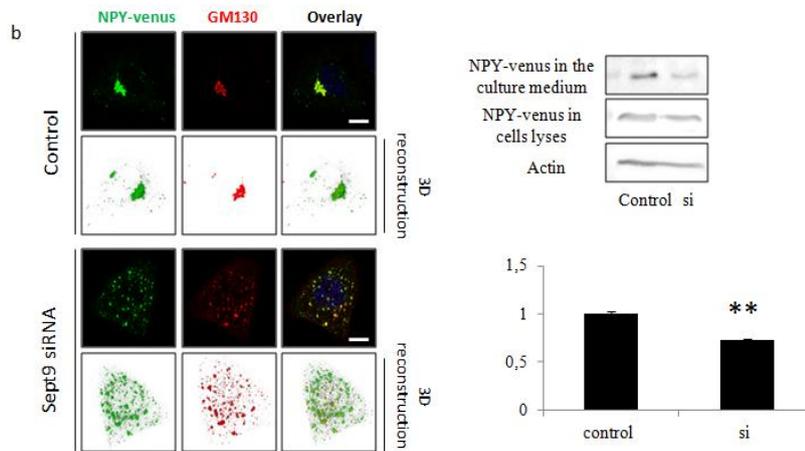
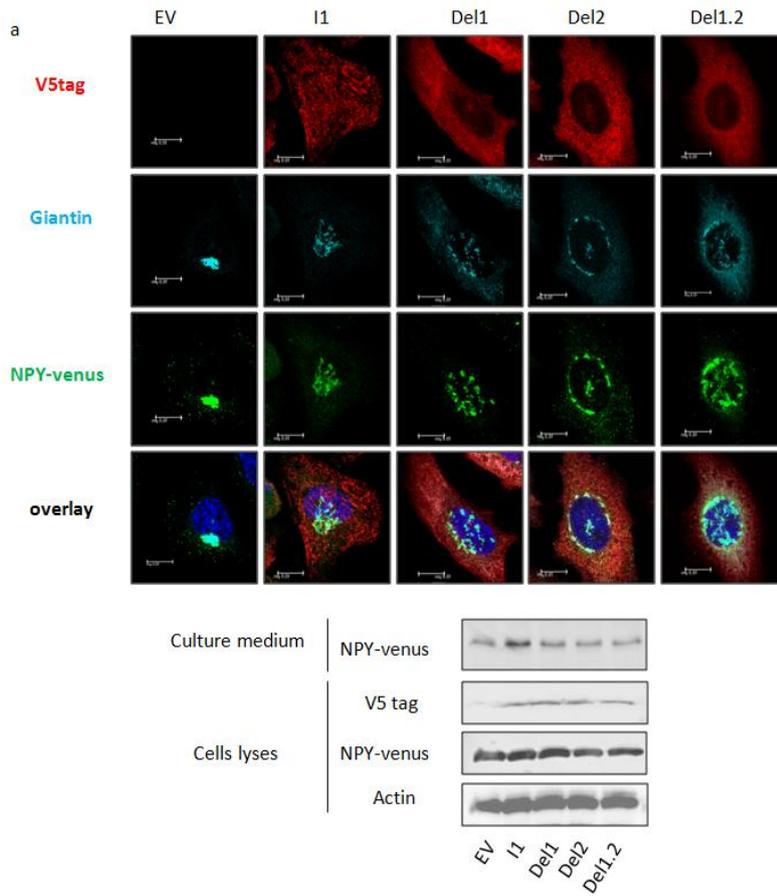
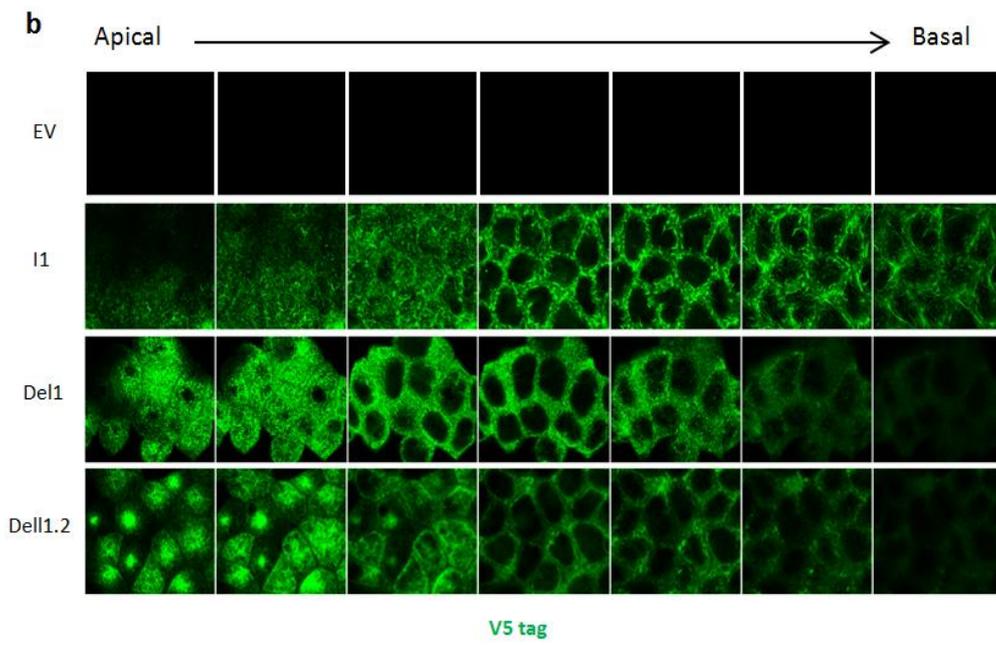
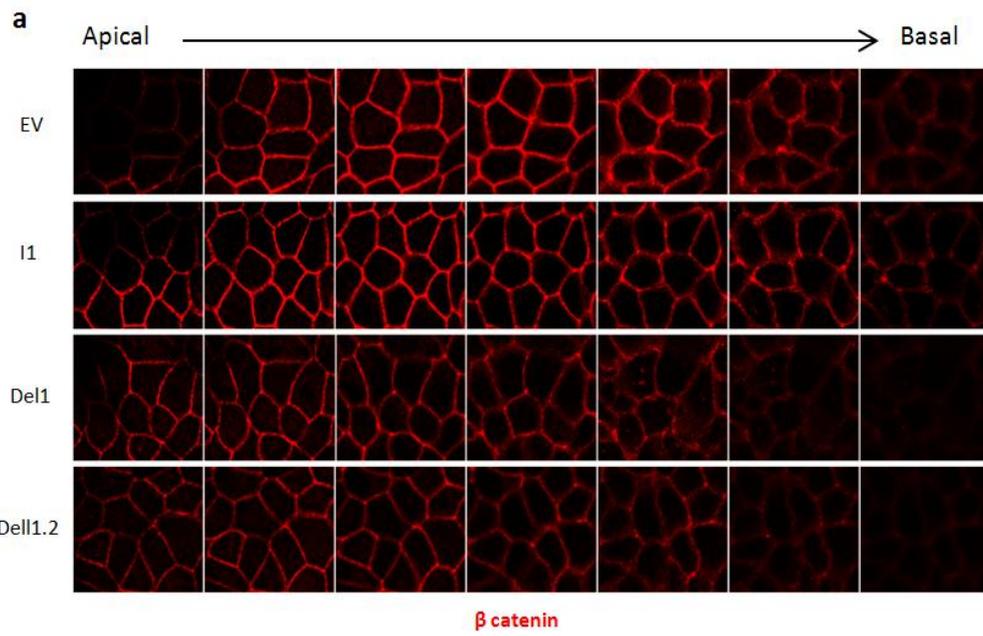


Figure S7



## Article 2

### **Septin 9 induces lipid droplets growth by a phosphatidylinositol-5-phosphate and microtubule-dependent mechanism hijacked by HCV**

**Nature Communations (sous presse)**

L'apparition d'une stéatose hépatique caractérisée par une accumulation de gouttelettes lipidiques (GLs) dans les cellules infectées est un des aspects histologiques particuliers de l'infection chronique par le VHC et elle facilite l'installation d'une cirrhose et le développement d'un carcinome hépatocellulaire (Levrero, 2006), (Westbrook and Dusheiko, 2014).

Les GLs sont formées d'un coeur hydrophobe constitué de lipides neutres (triglycérides, diglycérides...) entourés par une monocouche de phospholipides. Elles sont désormais considérées comme de véritables organites cellulaires qui participent à de nombreuses fonctions cellulaires (Walther and Farese, 2012)(Thiam et al., 2013). L'association des particules virales, et plus spécifiquement celle des protéines core et NS5A, avec des GLs est importante pour l'assemblage et la réplication du VHC (Filipe and McLauchlan, 2015). Cependant les mécanismes moléculaires qui régulent la biogenèse et le devenir des GLs dans l'infection par le VHC et les composants de la cellule hôte impliqués dans ces processus restent encore mal connus.

Les phosphoinositides (PIs) sont des composants mineurs des phospholipides membranaires et représentent des éléments clés de la signalisation cellulaire et du trafic vésiculaire. Plusieurs études récentes montrent l'importance du métabolisme des PIs dans l'infection par le VHC (Trotard et al., 2009), (Reiss et al., 2011). L'implication des septines dans la dynamique membranaire semble dépendre de leur capacité à se lier aux phosphoinositides (PIs). Ainsi les septines pourraient représenter des médiateurs importants de la relation cellule hôte/pathogène (Kim et al., 2007)(Mostowy and Cossart, 2012)(Fung et al., 2014).

Ces différentes données suggèrent que les septines et les PIs pourraient jouer un rôle dans l'infection par le VHC.

L'analyse transcriptomique réalisée sur des extraits de foies cirrhotiques provenant de sujets infectés par le VHC a révélé une augmentation de l'expression de la septine 9 en comparaison

avec des extraits de foies normaux. De plus, en culture cellulaire, l'infection par le VHC induit une augmentation de l'expression de la septine 9 ainsi que son assemblage en filaments. L'inhibition de l'expression de la septine 9 diminue de façon très significative la réplication virale. La septine 9 régule la taille, la quantité et l'accumulation périnucléaire des GLs et leur association avec la protéine core du VHC.

Le dosage des lipides neutres montre une augmentation significative des triglycérides après surexpression de la septine 9 et les résultats inverses sont obtenus par l'inhibition de son expression suggérant un rôle de la septine dans la biogenèse des GLs. D'autre part on observe une expression forte et une structure filamenteuse de la septine 9 dans les cellules avec un milieu de culture supplémenté en acide oléique. Avec ce modèle, nous avons pu démontrer que la septine 9 et PtdIns5P avaient un rôle intrinsèque dans la formation des GLs.

Avec l'aide de mutants de septine 9 délétés d'un site polybasique (PB1) impliqué dans la liaison avec les PIs, nous avons montré que l'interaction des septines avec les PIs est nécessaire à la formation des GLs.

L'ensemble de ces résultats a révélé dans le foie un nouveau rôle pour la septine 9 dans la régulation des GLs ainsi que dans la réplication du VHC.

## **Septin 9 induces lipid droplets growth by a phosphatidylinositol-5-phosphate and microtubule-dependent mechanism hijacked by HCV**

Akil Abdallah<sup>1,2,7\*</sup>, Juan Peng<sup>1,2,\*</sup>, Mohyeddine Omrane<sup>1,2\*</sup>, Claire Gondeau<sup>3,4</sup>, Christophe Desterke<sup>5</sup>, Mickaël Marin<sup>1,2</sup>, Hélène Tronchère<sup>10</sup>, Cytia Taveneau<sup>6</sup>, Sokhavuth Sar<sup>1,2</sup>, Philippe Briolotti<sup>3,4,5</sup>, Soumaya Benjelloun<sup>7</sup>, Abdelaziz Benjouad<sup>8</sup>, Patrick Maurel<sup>3,4,5</sup>, Valérie Thiers, Stéphane Bressanelli<sup>6</sup>, Didier Samuel<sup>1,2</sup>, Christian Bréchet<sup>1,2,9</sup> and Ama Gassama-Diagne<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM, Unité 1193, Villejuif, F-94800, France

<sup>2</sup> Univ Paris-Sud, UMR-S 1193, Villejuif, F-94800, France

<sup>3</sup> INSERM U1183, Institute of regenerative medicine and biotherapy, University of Montpellier, 34295 Montpellier, France.

<sup>4</sup> Department of Hepato-gastroenterology A, Hospital Saint Eloi, CHRU, 34295 Montpellier, France.

<sup>5</sup> Univ Paris-Sud, -UFR medecine- INSERM UMS33

<sup>6</sup> Virologie Moléculaire et Structurale

CNRS UPR 3296 - INRA UsC 1358

91198 Gif-sur-Yvette cedex France

<sup>7</sup> Laboratoire des Hépatites Virales, Département de Virologie. Institut Pasteur du Maroc, BP 20360, Casablanca, Maroc.

<sup>8</sup> Université Mohammed V Agdal-Rabat, UFR de Biochimie-Immunologie. Faculté des Sciences Rabat-Agdal, Rabat-Maroc

<sup>9</sup> Institut Pasteur, 75015 Paris, France

<sup>10</sup> INSERM U1048, I2MC and Université Paul Sabatier, 31432 Toulouse, France

Correspondence should be addressed to ama.gassama@inserm.fr

\* These authors contributed equally to this work

## **ABSTRACT**

The accumulation of lipid droplets (LD) is frequently observed in hepatitis C virus (HCV) infection and represents an important risk factor for the development of liver steatosis and cirrhosis. The mechanisms of LD biogenesis and growth remain open questions. Herein, our transcriptomic analysis revealed a significant upregulation of septin 9 in HCV-induced cirrhosis compared to that in the normal liver. HCV infection increased septin 9 expression and induced its assembly in filament. Septin 9 regulates LD growth and perinuclear accumulation dependent of dynamic microtubules. The effects of septin 9 on LDs are dependent on binding to PtdIns5P, which, in turn, regulates LD growth and controls the formation of septin 9 filaments and its interaction with microtubules. This unprecedented described cooperation between PtdIns5P and septin 9 regulates oleate-induced accumulation of LDs. Overall, our data offer a novel paradigm for LD growth through the unexpected implication of a septin 9/PtdIns5P signalling pathway.

## **INTRODUCTION**

LDs are highly dynamic organelles generated from the endoplasmic reticulum (ER)<sup>1</sup>, which can remain attached to the ER or generate contacts with other organelles, including the mitochondria, lysosomes, peroxisomes, and Golgi<sup>2</sup>. LDs consist of a hydrophobic core of neutral lipids, which are primarily composed of triacylglycerols (TAGs) and cholesterol esters (CEs), surrounded by a monolayer of phospholipids and a large group of proteins that facilitate cellular signalling interactions, control the access of metabolic enzymes, and influence LD movement within the cell<sup>1,3</sup>. These proteins include predominantly the perilipin family (Plins) and proteins of the rab family of GTPases<sup>1,4</sup>. There are five known perilipins

(PLINs 1–5) expressed in hepatocytes, which play distinct roles. PLIN2 also called ADRP (Adipose differentiation-related protein) is a prominent LD protein that coats the surface of LDs in all mammalian cells. Consequently, PLIN2 expression level is tied to LD accumulation<sup>5</sup>. PLIN3 initially described as a tail-interacting protein of 47 kDa (TIP47) is also ubiquitously expressed<sup>6</sup>. LD growth and degradation are highly regulated processes and excessive accumulation of LDs in the liver causes steatosis, which may lead to inflammation and, thus, contributes to chronic hepatitis and cirrhosis. Cirrhosis is the final stage for several chronic liver diseases and often evolves to hepatocellular carcinoma (HCC).

HCV infection is a major public health problem. HCV chronic infection is a major risk factor for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Moreover, HCV chronic infection is frequently associated to steatosis, which, in turn, may favour chronic liver inflammation. Hepatitis C remains the major cause of liver resection and transplantation<sup>7</sup>. There is no vaccine to protect against HCV infection, although major advances have been recently achieved regarding HCV infection treatment, and the combination of drugs, including protease inhibitors, represents a real breakthrough that cure almost 90% of infected patients. However, these treatments have remained very costly. Additionally, understanding the key mechanisms driving HCV replication and persistence will have a profound impact, beyond HCV, for the appraisal of the pathogenesis of this family of viruses. Each step of the replication cycle of HCV is tightly dependent on the host cell lipid metabolism, and liver steatosis associated with the accumulation of lipid droplets (LDs) is a hallmark of chronic HCV infection<sup>8,9</sup>. HCV and LD interactions are crucial for persistent viral propagation and virion production<sup>10</sup>.

Hepatitis C virus (HCV) is an enveloped positive single-stranded RNA virus from the Flaviviridae family. HCV genomic RNA encodes for a large polyprotein precursor of

approximately 3100 amino acids post-translationally cleaved by cellular and viral proteases into the mature structural (core, E1, and E2) and p7 protein as well as non-structural (NS) proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B)<sup>9</sup>. The core protein plays a major role in the virion assembly through interaction with LDs<sup>11</sup>. The proteins covering the LD surface and their link with HCV life cycle have been characterised, whereas the potential role of phospholipids in these events remains unclear. The composition of the phospholipid monolayer of LDs depends on the cell type, but is mostly composed of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and, to a lesser extent, phosphatidylinositol (PtdIns) and lysophospholipids<sup>1,12,13</sup>. The phosphorylated derivatives of PtdIns (PIs) are important signalling molecules that are essential for a variety of cellular functions, including membrane remodelling and trafficking<sup>14</sup>. Although recent studies revealed the role of PtdIns 4-kinases (PI4K-III $\alpha$  and PI4K-III $\beta$ ) and their lipid product, PtdIns4P, as critical regulators of the HCV life cycle<sup>9</sup>. The role of class II phosphoinositide 3-kinase (PI3K) was also demonstrated<sup>15</sup>. Furthermore we demonstrated that PIs control epithelial morphogenesis and polarity<sup>16,17</sup> and represent HCV cellular targets<sup>18</sup>.

Septins form a family of GTP-binding proteins composed of 13 members in mammals and conserved from yeast to humans<sup>19</sup>. The complexity of this gene family is increased by the existence of alternative splicing, which dramatically increases the number of potential isoforms. Septins assemble into complexes variable in size and composition between organisms<sup>20,21</sup>. In drosophila and mammalian septins, complexes contain in general three to four different septins present in two copies. The core hetero-oligomeric units of six to eight subunits serve to build higher order structures, including filaments and rings structures, which are important for septin *in vivo* biological function<sup>21</sup>. Septins are implicated in multiple cellular functions, including cytokinesis, ciliogenesis, cell migration, vesicle trafficking, and cell polarity<sup>22,23</sup>. Septins associate with the cytoskeleton and are known as a fourth type of

cytoskeletal structure<sup>24</sup>. Septins also bind to membranes, specifically to PIs, providing membrane stability and serving as diffusion barriers for membrane proteins<sup>21, 22, 23</sup>. Nevertheless, these septin/PI interactions have been scarcely investigated<sup>25,26,27</sup> and their link with HCV life cycle and their potential role in LD biogenesis and growth remain unclear. Septins are also involved in infection by pathogens, including bacteria, fungi<sup>24,28,29</sup>, and HCV virus<sup>30</sup>. Alteration in expression profile of septins are reported in different cancers and we determined that septin 9 is specifically upregulated in liver cancer<sup>31</sup>.

Despite being involved in carcinogenesis, septin 9 expression and function have not been investigated in precancerous diseases such as cirrhosis. In this study, we investigated the expression of septin 9 and the differential expression of the other septins in HCV-induced cirrhosis. We also demonstrated that septin 9 regulates LD growth through binding to PtdIns5P in HCV infected cells. Of interest, we showed that this new mechanism is involved in lipid homeostasis independently of HCV infection. Our study reveals the role of both septin 9 and PtdIns5P in lipid metabolism.

## **RESULTS**

### **Transcriptomic analysis of septin 9 and differential expression of septins in human cirrhosis**

To determine the expression profile of septin 9 in cirrhosis, we used the GSE14323 dataset<sup>32</sup>, including transcriptomes of normal liver (n = 19) and HCV-induced cirrhosis samples (n = 49). Data revealed a significant upregulation (two-tailed Student's *t*-test, *P* = 0.012) of septin 9 transcriptional expression in cirrhosis samples compared to that in normal liver samples (Fig. 1a).

As depicted in Figure 1b, septin 9 occupies a terminal position in an octameric septin complex involved in the formation of higher order structures such as filaments and rings<sup>33</sup>. According

to the importance of hetero-oligomerisation in the assemblies and functions of septins<sup>23</sup>, we assessed the differential expression of septins in HCV-induced cirrhosis using the GSE14323 dataset by unsupervised principal component analysis (Fig. 1c-f). Sample projection on the first factorial map showed a significant separation between the normal liver and HCV-induced cirrhosis samples according to the first axis ( $P = 2.67E-15$ ) (Fig. 1c). Learning machine algorithm of Random Forest confirmed a good separation of the normal liver and cirrhosis samples. The classification error by class was low and especially null for the cirrhosis class after building 500 classification trees and multidimensional Scaling plot (MDSplot), confirming the good separation of the samples after learning machine analysis (Fig. 1d and S1). Random Forest analysis predicted that most septins are affected in HCV-induced cirrhosis when compared to normal liver, while septin 10 was less affected. This was confirmed by individual boxplot performed on each septin (Fig. 1e, p-value were calculated by two-tailed Student *t*-test). These analyses showed that the expression of septin 7 and 2 is massively affected in these samples (Fig. 1d,e). A weak error on misclassification by class (confusion of 1.67%) was detected when using the learning machine algorithm (Fig. S1c). Thus, we performed an unsupervised classification on these samples with previously used septin expression (classification tree with Euclidean distance and complete linkage, Fig. 1f). This unsupervised algorithm performed on 58 clinical samples allowed the discrimination of two major groups of experiments with no error of misclassification between normal liver and HCV-induced cirrhosis samples. This result suggests that the expression of septin protein family is deregulated in HCV-induced cirrhosis as compared to that in the normal liver.

### **HCV assembles endogenous septin 9, which stabilises microtubules (MTs)**

Following the above described transcriptomic study, which indicated a significant increase of septin 9 in HCV-induced cirrhosis samples, we hypothesised that HCV could be responsible of the upregulation of septin 9 in cirrhosis. To explore this possibility, Huh7.5 cells were

inoculated for 24, 48, and 72 h with HCV JFH-1 (Japanese fulminate hepatitis 1), a genotype 2a strain, which produces infectious particles in culture and recapitulates all steps of the HCV life cycle<sup>34</sup>. Immunoblot data revealed a non-significant, time-dependent increase of septin 9 expression in non-infected cells, while septin 9 expression was significantly enhanced in JFH-1 infected cells (Fig. 2a), with the highest expression at 72 h of infection (Fig. 2a) when septin 9 formed bundles of filaments surrounding the clusters of HCV core (Fig. 2b). Treatment of Huh7.5 cells with two different septin 9 siRNAs (si1 and si3) prior to their infection strongly reduced core expression (Fig. 2b,c). These data suggested that HCV-regulated septin 9 assembly and expression was required for HCV core protein cellular expression.

Thus, to further characterise the septin 9 filamentous structure, we determined the presence of other septins. We focussed on septin 2, the major ubiquitously expressed septin and the most deregulated in HCV-induced cirrhosis (Fig.1). As shown in Figure 2d-e, in non-infected cells, septin 2 formed short filaments that co-localised with septin 9. These filamentous structures containing septin 2 and their co-localisation with septin 9 were significantly increased upon JFH-1 infection (Fig. 2d-f). Depletion of septin 9 using si3 disrupted septin 2 filaments and reduced its staining when compared to that in control cells in both non-infected and JFH-1 infected cells (Fig. 2d,e). These data were confirmed by immunoblot analysis (Fig. 2g) and suggested the role of septin 9 in the formation of septin filamentous structure, consistent with previous reports<sup>33</sup>.

Next, we assessed the effects of the modulation of septin 9 expression on the microtubule (MT) network. Tubulin staining indicated a strong MT network in HCV infected cells when compared to that of non-infected cells (Fig. 2h,i and Fig. S2a). Importantly, MTs co-localised with septin 9 filaments and si3 severely destroyed MT filaments (Fig. 2h-j), indicating a regulatory role of septin 9 in HCV-dependent MT organisation.

## **Septin 9 regulates LD behaviour, HCV protein expression, and HCV replication**

The accumulation of LDs is an important feature of HCV infection<sup>4</sup>. Thus, to understate the importance of septin 9 in HCV life cycle, Huh7.5 cells were treated or not with si3 and infected with JFH-1. Immunofluorescence indicated that JFH-1 infection sharply increased LDs that formed clusters co-localised with the core protein around the nucleus (Fig. 3a). si3 treatment dramatically decreased the cellular content of LDs (Fig. 3b) as well as LD co-localisation with core (Fig. 3c,d). Furthermore, LD distribution between the perinuclear area and the cell periphery was evaluated and a typical profile was presented (Fig. 3e,f). About 30 cells were analysed from two independent experiments and the data are presented as bar graph in Figure 3g. In non-infected cells, about 70% of LDs were present in the perinuclear area and si3 treatment decreased the percentage to 55%. JFH-1 infection increased the perinuclear LDs up to 92% and septin 9 depletion decreased the level of LDs to 62% (Fig. 3g). These changes in the level and distribution of LDs were accompanied by a 2.5-fold increase of LD size in JFH-1 infected cells, while si3 decreased the LD size by half (Fig. 3h). Similar changes were observed for LD number (Fig. 3h). PLIN2 is among the best studied protein associated with LDs and is considered as a marker of LDs<sup>35</sup>. Thus, to emphasise the role of septin 9 in HCV-induced LD accumulation, we analysed PLIN2 expression. A strong increase in PLIN2 expression and its co-localisation with core was observed in JFH-1-infected cells and si3 treatment abolished these effects (Fig. S3). Taken together, these data indicate a role for septin 9 in the regulation of LD growth and perinuclear distribution. Finally, we evaluated HCV replication by RT-PCR. A strong decrease of HCV genomic RNA was observed after septin 9 knockdown (Fig. 3i), suggesting a critical role of septin 9 in the replication of HCV. We also analysed the transcript level of the five well-characterised variants of septin 9 (i1 to 5) by qRT-PCR after JFH-1 infection. Variant 1 mRNAs were the most abundant, while

variant 3 mRNAs were almost undetectable (Fig. S2b). Accordingly, the following studies focused on septin 9 variant 1 (septin 9\_i1) and we used Huh7 cells stably expressing HCV full length *genomic* replicon from genotype 1b (Huh7R)<sup>36</sup>. This system permitted the efficient expression of all viral proteins and is a convenient and valuable tool for molecular studies. First, Huh7R cells were transfected with two concentrations of septin 9 siRNA, which resulted in a decrease in both the core and envelope E2 proteins (Fig. S4a). Next, Huh7R cells were transfected with V5 cDNA-tagged septin 9 variant 1 (septin 9\_i1) the most expressed in JFH-1 infection (Fig. S2b) or with an empty vector (EV) used as a control. Immunoblot data showed an increase in both core and E2 expression in cells expressing septin 9\_i1 compared to control cells (Fig. S4b). Later, septin 9\_i1 and the LD characteristics were assessed by immunofluorescence analysis. Septin 9\_i1 assembled in filaments surrounding the large clusters of LD and opposite results were obtained with septin 9 siRNA, which inhibited LD accumulation (Fig. 4a). Overall, profiles of LD distribution and changes in LD morphology (Fig. 4b,c) were similar to the results obtained using the JFH-1 strain (Fig. 3). Furthermore, septin 9\_i1 filaments co-localised with endogenous septin 2 (Fig. S5a), indicating that septin 9\_i1 is integrated in a hetero-oligomeric structure composed of other septin members consistent with the results obtained using the JFH-1 strain (Fig. 2). Moreover, immunoblot analysis revealed that the ratio of the intensity of exogenous septin 9\_i1 revealed with an anti-V5 tag antibody to the intensity of endogenous septin 9 detected with septin 9 antibody was 1.1 (Fig. S5b). Thus, we concluded that septin 9\_i1 expression was similar to that of endogenous septin 9.

Although the first evidence for HCV interaction with LDs was obtained from a study on the core protein, several recent studies indicated that the interaction of the HCV non-structural protein NS5A with PLIN3 is essential for the recruitment of NS5A on LDs to promote the release of HCV particles<sup>37,38</sup>. Therefore, we analysed both PLIN3 and NS5A in Huh7R cells

expressing septin 9\_i1. Interestingly, increases in PLIN3 and NS5A expression were observed (Fig. S5c) and these results were confirmed by immunoblot (Fig. S5d). Overall, these data indicated that septin 9\_i1 regulated LDs growth and HCV protein expression.

### **Septin 9 regulates neutral lipid metabolism**

LD growth can be mediated by several mechanisms, but, typically, its size expansion involved an increase in the neutral lipid content, which essentially consists of TAG and CE<sup>5</sup>. Therefore, we analysed the neutral lipid content of septin 9\_i1-expressing cells. As shown in Figure 4d, transfection of septin 9\_i1 in Huh7R cells induced a three-fold increase of TAG and correlated with a decrease of diacylglycerol (DAGs). As a consequence, the ratio of TAG to DAG was greatly increased (Fig. 4e). The fatty acid composition of TAG and DAG was also analysed. The composition of these two lipids was very similar and consisted mostly of C16 and C18 long-chains (Fig. 4f). Similar data were obtained using septin 9 depleted Huh7R cells (Fig. 4g-i). A significant TAG decrease and an increase in DAG were observed (Fig. 4g), suggesting a conversion of the TAG pool into DAGs.

Diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1) is one of the two known DGAT enzymes that catalyse the final step in triglyceride biosynthesis<sup>39</sup>. The role of DGAT1 in the trafficking of the HCV core protein to LDs is of interest, and its involvement in the production of infectious HCV particles was reported<sup>40,41</sup>. Thus, we analysed DGAT expression by immunofluorescence and observed a significant increase in the total intensity of the DGAT1 signal in septin 9\_i1-expressing cells. Moreover, DGAT1 co-localised with septin 9\_i1 filaments, as shown at the highest magnification (Fig. 4j). Together, these data indicated that septin 9 could also participate in LD growth by regulating lipid biosynthesis.

### **Dynamic MTs are required for septin 9-induced LD perinuclear accumulation**

Different reports indicated that MTs play a role in the dynamics and growth of LDs<sup>42,43</sup>. Furthermore, septins interact with MTs and are essential for MT-dependent cell

processes<sup>13,23,24, 44</sup>. Therefore, we postulated that MTs could play a role in septin 9-induced LD growth. Consequently, we performed a nocodazole washout (WO) to analyse the importance of MTs in the role of septin 9 on LD growth (Fig. 5). Huh7R cells expressing septin 9\_i1 were treated with nocodazole for MT depolymerisation. This treatment resulted in the dispersion of LDs throughout the cell and decreased their size. One hour after nocodazole removal, LDs started to gather around the nucleus and increased in size. These changes were accompanied by the partial recovery of the microtubule filamentous structure (Fig. 5a). Finally, LDs were restored to their initial size and relocated around the nucleus 3 hours after nocodazole removal (Fig. 5b-d). Taken together, these results indicate that MT dynamics are required for septin 9 to induce LD growth and perinuclear clustering.

### **PtdIns5P binds to septin 9 and promotes its assembly and growth of LDs**

To further identify the mechanism underlying septin 9 assembly and its role on LD accumulation, we assessed the importance of phosphoinositides (PI). The phospholipid monolayer that surrounds LDs plays a role in the regulation of the morphology of LDs. Phosphatidylcholine (PC) stabilises the tension and reduces LD growth, while phosphatidic acid contributes to the expansion of LDs<sup>45</sup>. PtdIns was also detected in the phospholipid monolayer that covers the LD surface<sup>12</sup>. However, the presence and the role of its phosphorylated derivatives, PIs, on LD growth and biogenesis have not been investigated. Therefore, to gain further mechanistic insights into the role of septin 9 in LD growth, we examined the contribution of its interaction with PIs. First, we identified the PIs that bind to septin 9 by performing a protein-lipid overlay assay. A glutathion *S*-transferase (GST) tagged recombinant protein of septin 9 was incubated with a Lipid Strips membrane spotted with fifteen different biologically important lipids (Fig. 6a). Data from the assay revealed that septin 9 bound specifically to mono-phosphorylated PtdIns (PtIns3P, PtIns4P, and PtIns5P)

and the strongest interaction was observed with PtdIns5P. In the same experimental conditions, no signal was detected using recombinant GST protein alone as a negative control (Fig. 6a), supporting the specificity of the observed binding signals.

Hence, we investigated PI binding to septin 9 (Fig. 6a). Cell-permeant, PtdIns3P, PtdIns4P, and PtdIns5P were added to the culture medium of Huh7R cells to assess the effect on LDs. PtdIns4,5P2 was also evaluated as a non-binding septin PI (Fig. 6b). The three mono-phosphorylated compounds promoted a significant increase in LD size compared to non-treated cells, whereas PtdIns4,5P2 had no significant effect (Fig. 6b, c). PtdIns5P was the most efficient (Fig. 6b, c), consistent with the results of the protein-lipid overlay assay (Fig. 6a). Interestingly, septin 9 assembled surrounding the LDs that became more visible upon the addition of PtdIns5P (Fig. 6b). Taken together, these data revealed the crucial role of mono-phosphorylated PIs in the expansion of LDs and the organisation of septin 9 high-order structures. Thus, we focused on PtdIns5P, which was the most effective on LDs. PtdIns5P specifically binds to the plant homeodomain (PHD) finger found in many chromatin-remodelling proteins, and the PHD domain of the tumour suppressor Inhibitor of Growth (ING2) was proposed to function as a receptor of PtdIns5P<sup>46</sup>. We used the biotinylated GST-tagged PHD domain of ING2 as a probe to visualise cellular PtdIns5P, as previously described<sup>47</sup>. As expected, compared to untreated cells, PtdIns5P addition strongly increased both the PHD signal and the LD size and confirmed that addition of exogenous PtdIns5P increased its intracellular level (Fig. S6a-c). To validate the role of PtdIns5P on LDs, we used another approach to increase the cellular content of PtdIns5P based on IpgD, the virulence factor of *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), which is a PtdIns(4,5)P2 4-phosphatase responsible for the profound increase of PtdIns5P in *S. flexneri*-infected cells<sup>48</sup>. Huh7R cells were transfected with GFP-tagged-IpgD cDNA (GFP-IpgD). Immunostaining of the transfected cells using the

PHD probe revealed that IpgD expression increased PtdIns5P signal (Fig. S6d) and promoted an increase in LD size and cellular accumulation (Fig. 6d).

### **FYVE finger containing phosphoinositide kinase (PIKfyve) regulates septin 9 filaments and LD accumulation**

To further evaluate the importance of the interaction between septin 9 and PtdIns5P and its importance in LD accumulation, we used YM201636, a selective inhibitor of PIKfyve, a major contributor to the intracellular production of PtdIns5P<sup>49</sup>. First, the effect of YM201636 was verified by PtdIns5P immunostaining in Huh7R cells (Fig. 7a). Subsequently, the cells were transfected either with an empty vector or a septin 9\_i1 construct and treated with YM201636. LDs were then stained. LD size and level increased in cells expressing septin 9\_i1 (Fig. 7b,c). Additionally, LDs were surrounded by septin \_i1 filaments as described in Figure 4. YM201636 treatment profoundly reduced the LD size (Fig. 7b,c and S7a) and decreased TAGs concomitantly with an increase of DAGs in treated cells (Fig. S7b-d). YM201636 treatment also disrupted septin 9\_i1 filaments (Fig. 7b and S7a), suggesting that PtdIns5P regulated septin 9 high order structure formation and septin 9-induced LD growth. We also investigated the role of PtdIns5P on MT organisation. Interestingly, YM201636 treatment of Huh7 cells expressing septin 9\_i1 disrupted MT filaments and prevented their co-localisation with septin 9\_i1 (Fig. 7c). Furthermore, PtdIns5P addition to Huh7R cells transfected with septin 9 siRNA partly rescued the disruption of MT filaments and LD clustering caused by septin 9 depletion (Fig. S8). Thus, these data demonstrated that PtdIns5P is a crucial regulator of septin 9 structural and functional features.

In non-infected Huh7 cells, PtdIns5P was detected mostly in the perinuclear region (Fig. S9a). The signal increased in Huh7R cells and transfection of the later cells with septin 9\_i1 cDNA significantly enhanced the PtdIns5P signal (Fig. S9b,c). In addition, infection of Huh7.5 cells using JFH-1 particles greatly increased the level of PtdIns5P (Fig. S9a), indicating that both

septin 9 and HCV regulated PtdIns5P levels. These data suggested that HCV exploits the interaction between septin 9 and PtdIns5P to accumulate LDs.

### **Septin 9 assembles and interacts with MTs through its polybasic region (PBR), required for LD growth**

Septins bind PIs *in vitro* via the PBR near their N terminus<sup>27,50</sup>. The conserved sequence encompassing residues aa289 to aa294 is boxed in Figure 8a. Thus, as another approach to assess the importance of PI for septin 9 structural and functional features, we generated a PBR-deleted mutant (septin 9\_del1) from the cDNA of V5-tagged septin 9 variant 1 (septin 9\_i1). The recombinant proteins from the entire septin 9\_i1 and the deleted construct were produced in *Escherichia coli*, purified to near homogeneity, and analysed by sodium dodecyl sulfate (SDS) gel electrophoresis (Fig. 8b). Coomassie blue staining revealed a major band of the expected molecular weight (70 kDa) for both septin 9\_i1 and the deleted mutant, while some lower molecular weight species co-purified with septin 9\_i1 (Fig. 8b). Immunoblot (Fig. 8c) confirmed that all detected protein bands were recognised by a V5-tag antibody. Purified recombinant proteins were used to perform a lipid overlay assay. Septin 9\_i1 bound mono-phosphorylated PtdIns (PtdIns3P, PtdIns4P, and PtdIns5P) as expected, although a signal was observed with phosphatidic acid and PtdIns(3, 5)P<sub>2</sub>. The lipid-binding signal was strongly reduced for the mutant (septin 9\_del1) (Fig. 8d). Subsequently Huh7R cells<sup>36</sup> were transfected with the septin 9\_i1, septin 9\_del1 cDNAs, or empty vector (EV). Septin 9\_i1 formed filaments detected by V5 tag antibody whereas septin 9\_del1 could not form filaments (Fig. 8e). Additionally, expression of septin 9\_i1 increased LD signal in the perinuclear region compared to cells transfected with empty vector based on the fluorescence intensity (Fig. 8e,f). In contrast, septin 9\_del1 expression significantly reduced the total level of LDs and their perinuclear distribution (Fig. 8e,f). These changes in the LD distribution were

accompanied by significant decrease of the LD size and number in cells expressing septin\_9 del1 (Fig. 8g). We next assessed PBR contribution to septin 9 colocalization with MT (Fig. 8h). Septin 9\_i1 formed filament structures co-localising with MTs. By contrast, the mutant septin 9\_del1 lost the filamentous structure. The Pearson co-localisation coefficient (Rr) between septin 9 and MTs dropped from  $0.56\pm 0.01$  in cells transfected with septin 9\_i1 cDNA to  $0.17\pm 0.03$  in cells expressing septin 9\_del1 and the RGB line profile showed a similarity between MTs and septin 9\_i1 cellular distribution (Fig. 8h). These results indicate that PBR is necessary for the formation of filamentous structures of septin 9 and controlling LD growth and accumulation. Furthermore, the PBR is involved in MTs organisation and highlighted the critical role of septin 9 in cytoskeleton organisation.

### **Septin 9 regulates LDs growth in naives cells**

Unravelling this new role of septin 9 in LD growth and their perinuclear accumulation led us to examine its relevance independently of HCV infection. We performed a set of experiments using naive Huh7 cells. Septin 9\_i1 expression significantly increases LDs size comparing to EV transfected cells (Fig. S10 a,b). Additionally, neutral lipids analysis revealed an increase TAG in septin 9\_i1 transfected cells (Fig. S10 c,d). Expression of GFP-IpgD (Fig. S10 e,f) or the addition of exogenous mono phosphorylated PIs to huh7 cells increase LDs size (Fig. S10 g). In contrast, septin 9\_del1 transfection or septin 9\_i1 transfected cells treatment with YM201636 significantly decrease LDs size (Fig. S10h). Moreover, septin 9\_del1 transfection or septin 9\_i1 transfected cells treatment with YM201636 disrupted septin 9 filamentous structure and its co-localisation with MTs (Fig. S11a-c) and similar effects were observed on actin filaments in septin 9\_del1 expressing Huh7 cells (Fig. S11d). Taken together, these results indicate the fundamental role of septin 9 and PtdIns5P in LD accumulation and cytoskeleton dynamic independently of HCV infection.

### **Septin 9 and PtdIns5P regulate sodium oleate-induced LD growth**

To emphasise the function of septin 9 and PtdIns5P in lipid homeostasis, we used sodium oleate, commonly used to induce LD formation. Huh7 cells were grown for 24 h. The culture medium was supplemented with sodium oleate (0–200  $\mu$ M) and cells were incubated for an additional 24 h. Neutral lipid analysis revealed a concentration-dependent increase of TAG and a decrease of DAG due to the addition of sodium oleate, validating the effect of sodium oleate (Fig. S12). The immunofluorescence data indicated a dose-dependent enlargement of the LDs and an increase of endogenous septin 9. Remarkably, in cells supplemented with sodium oleate at a concentration of 200  $\mu$ M, septin 9 filaments were visible around the very large clusters of LDs (Fig. 9a). Immunoblot data confirmed the gradual increase of septin 9 expression with the sodium oleate concentration and a concomitant increase of PLIN2 expression (Fig. 9b).

To further investigate the association of septin 9 with LD formation, we performed membrane flotation assays as previously reported<sup>37</sup> (Fig. 9c,d). As described in methods, cell lysates from Huh7 cells and from the same cells treated with 100  $\mu$ M sodium oleate as described above (Fig. 9a) were separated in a self-forming linear 10–20% iodixanol density gradient and twenty five fractions were collected from top to bottom and assessed by western blotting for septin 9, septin 2, PLIN2 and calnexin were also analysed as markers of LDs and endoplasmic reticulum (ER), respectively. The lowest-density membrane fractions (fractions 1–8) are called “LD rich” and the fractions (9–15) represented the “ER/endosome-rich” fractions, while the fractions (16–25) contained soluble and aggregated proteins as previously determined<sup>37</sup>. In non-treated Huh7 cells, septin 9 was mainly found in the ER/endosome-rich and the soluble/aggregated protein fractions, but not within low-density LD-rich fractions (Fig. 9c, upper panels). Similar distribution profiles were observed for septin 2 and calnexin, while PLIN2 was detectable in “LD rich” fractions. These data suggested that, in non-treated cells,

septins are mainly associated with LDs in the ER. This distribution changed in the presence of sodium oleate, septin 9 and septin 2 increased in low-density LD-rich fractions with high expression of PLIN2 and decreased from the ER/endosome-rich fractions totally depleted of PLIN2. There was no visible change in the distribution profile of the different proteins among the soluble/aggregated protein fractions. Overall, these results suggested that septin 9 and septin 2 are associated with the ER site of LD biogenesis and sodium oleate promoted LD biogenesis and enhanced septins association with PLIN2 in floating LDs in the light fractions. Subsequently, we explored the role of septin 9 on oleate-induced LD accumulation. Transfection of Huh7 cells treated with 100  $\mu$ M sodium oleate with septin 9 cDNA significantly increased the LD size, while transfection with the septin 9<sub>del1</sub> construct or with septin 9 siRNA (si3) produced the opposite effect (Fig. 10a,b). Furthermore, YM201636 treatment significantly decreased the LD size (Fig. 10c), indicating that the cooperation between PtdIns5P and septin 9 regulates oleate-induced accumulation of LDs.

## **DISCUSSION**

In this study, we showed a deregulation of septin expression in HCV-induced cirrhosis compared to that in the normal liver. Subsequent studies using HCV-infected cells revealed an unexpected role for septin 9 in the control of cellular lipid homeostasis through its binding to PtdIns5P required for microtubules stabilisation and LD perinuclear accumulation. As depicted in our model in Figure 10d this new role of septin 9 was also observed independently of the presence of HCV in naïve cells and in sodium oleate-induced LD accumulation. Additionally, septin 9 regulates HCV replication and assembles around the perinuclear clusters of the core in HCV-infected cells. Septin 9 promotes the perinuclear recruitment of proteins coating the LD surface such as PLIN2 and PLIN3 as well as the HCV core and the non-structural NS5A. Furthermore, PLIN3 playing an essential role in the HCV replication process<sup>38</sup>. Thus, one could speculate that HCV recruits septin 9 to control LD growth and

creates a lipid-enriched environment, facilitating HCV replication. Septins are crucial cytoskeletal components that are exploited by many pathogens such as *S. flexneri*, *Listeria monocytogenes*<sup>51</sup>, *Candida albicans*<sup>52</sup>, and *Chlamydia trachomatis*<sup>28</sup> that invade and develop in host cells. Moreover, septin 6 controls HCV replication via a direct interaction with a RNA binding protein, acting as a scaffold protein to facilitate the positioning of the HCV replication complex<sup>30</sup>. However, the roles of the LDs were not investigated in these studies related to septin/ pathogen interactions. Here we demonstrated that IpgD the virulence effector of *S. flexneri* increased the cellular content of PtdIns5P and induced LD growth. Eventhough this result confirmed the role of PtdIns5P in LD growth and accumulation, its enabled speculation on the potential role of LDs in infection by *S. flexneri*. Therefore, the findings of this study can be extended to other types of pathogens beyond HCV.

Despite the numerous publications about LD biology, several questions related to their biogenesis, growth, and dynamics remain unanswered<sup>1,4,45</sup>. LD formation likely occurs at the ER, and different mechanisms are involved in LD growth, including growth from nascent LDs in the ER or in the vicinity of the ER via the incorporation of TAGs and phospholipids locally synthesised into LDs. These proposed mechanisms arose from the observations that key enzymes of phospholipid and neutral lipid synthesis are present on the LD surface<sup>45</sup>. LDs might also expand via fusion of existing LDs. These fusion processes include the absorption of small LDs by large LDs mediated by Fsp27 (a 27 kDa fat-specific protein) enriched at the contact site between LDs<sup>53,54</sup>. Fusion mechanisms can also be mediated via phospholipid metabolising enzymes that produce fusogenic compounds at the LD surface<sup>55,56</sup>. This fusion between LDs involves the SNARE proteins<sup>57</sup>. In this study, we demonstrated that septin 9 significantly regulates the cellular content of TAG, a neutral lipid component essential for LD biogenesis. Furthermore, septin 9 promotes perinuclear accumulation of neutral lipid synthesis enzymes such as DGAT1 and regulates the expression of PLIN2 and PLIN3, two

PLINfamily proteins crucial for LD formation. These data support a role of septin 9 in LD growth and biogenesis.

Nonetheless, we cannot rule out a role for septin 9 in LD fusion mechanisms. LD fusions are MT-dependent processes<sup>43</sup>. In this study, we demonstrated the requirement for dynamic MTs for septin 9-induced LD growth. Furthermore, LD fusion and size is related to the composition of the surrounding monolayer of phospholipids, including PtdIns. Interestingly, we demonstrated that septin 9 binds to mono-phosphorylated PtdIns, which is consistent with previously published data for *Saccharomyces cerevisiae*<sup>50</sup>. Interestingly, these mono-phosphorylated PIs promote LD growth and are reminiscent of the role of PtdIns4P in the homeostasis of LDs in yeasts<sup>58,59</sup>.

PtdIns5P is mainly present in the plasma and intracellular membranes, including the smooth ER and Golgi<sup>60</sup>, and remains the least characterised among the eight different PIs<sup>61</sup>. Notably, PtdIns5P regulates septin 9 assemblies in high order structures. PtdIns5P partly rescued the loss of microtubule filaments induced by septin 9 knockdown. These results are consistent with the reported role for PIKfyve in microtubule-dependent vesicular trafficking<sup>62</sup> and strongly indicate a new role for PtdIns5P as a partner of septin 9 in the regulation of MT and LD dynamics, providing new insights on PtdIns5P biological role. Consequently, we proposed that septin 9 could act as a scaffold that establishes contacts between MTs and LDs via binding to PtdIns5P that coats the surface of LDs and promotes LD growth and intracellular movement.

These results revealed an unprecedented role for PIs in LD biology in mammals, although a detailed mechanism awaits further investigations. PIs are important regulators of membrane trafficking in coordination with small GTPase proteins such as ARF GTPase, Rab GTPases, and the subunits of the COPI complex. These different components are present on the LD surface<sup>63,64</sup>. In addition, LDs interact with different cellular organelles, including the ER,

Golgi, and mitochondria<sup>65</sup>. Therefore, the existence of a different pool of LDs with a specific PI and Rab GTPase composition could be postulated and might help define LD identity as for endosomal compartments<sup>66</sup>. Thus, a study of the contribution of PI signalling to LD biogenesis and growth is of great interest in LD biology.

In conclusion, this study provides new insights for research on the increasing pathologies associated with lipid metabolism disorders such as steatosis, cirrhosis, and cancer.

## **METHODS**

### **Chemicals**

Phosphoinositides (PtdIns4P diC8 Cat#P4008, PtdIns5P diC4 Cat#P5004, PtdIns3P diC8 Cat#P3008, PtdIns(4,5)P2 diC8 Cat#P4508 ) and PIP strip Cat#P-6001 were purchased from Echelon. Nocodazole Cat#487928 from Calbiochem, YM201636 Cat#sc-204193 from Santa Cruz. Sodium oleate Cat#o-7501 and Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (Cat# I6758) were purchased from Sigma-Aldrich. Albumin BSAFFA Cat#126575 was from Calbiochem. Purified septin 9-GST variant 3 Cat# H00010801-P01 was purchased from Clinisciences. Purified GST was from GenScript and V5 peptide control for V5 antibody was from Novus biologicals.

### **Cell lines and Culture conditions**

Human hepatocarcinoma cells Huh7.5, Huh7 and stable Huh7 cells expressing HCV genomic replicon (Huh7R) were used<sup>36</sup>. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen) containing 4.5 g.l<sup>-1</sup> glucose and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids (GibcoBRL) and 1% penicillin/streptomycin (GibcoBRL). For Huh7R the described medium was supplemented with G418 at 400  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>.

### **Cell treatments**

Cells treatment with sodium oleate: Complexes of sodium oleate with BSA were prepared as previously described<sup>67</sup>. Briefly, the solution containing 20 mM sodium oleate and 2.4 mM Bovine Serum Albumin-Fatty Acid Free (BSAFFA) was heated to 55°C. The obtained complex was diluted in a pre-warmed culture medium at indicated concentration prior to addition to the cells. The treated cells were maintained in culture for 24 h and collected either for immunoblot or immunofluorescence experiments.

Cells treatment with YM201636: Cells were incubated for 1 h at 37°C in the pre-warmed culture medium containing 160 µM of YM201636 and collected for analyses.

Cells treatment with PIs: PIs as a lyophilized powder were solubilized at 500 µM in water by vortex. The solution was then diluted in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) to the concentration indicated in the legends of the experiment. Cells were washed with DPBS and the PIs solution was added to the cell for indicated time.

### **JFH1/HCVcc production and inoculation**

Huh7.5 were infected with cell culture-grown HCV JFH-1 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 TCID<sub>50</sub> cell<sup>-1</sup> (50% tissue culture infective doses). After incubation at 37°C for 16 h, the inoculum was removed then cells were washed three times with DMEM and were further maintained in culture for the indicated time in the legend and text.

### **Reverse Transcription and Real-time PCR analysis**

Total RNA was isolated using RNAsol solution (Eurobio) and HCV RNA copy number was quantified using the SuperScript III Platinum One-Step quantitative RT-PCR system (Invitrogen) and a Light Cycler Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I mix (Roche). PCR was carried on a Light Cycler ® 480 Real-Time PCR System (Roche). The sequence of the primer used in real-time RT-PCR analysis was presented in table 1 and 6-FAM-CCTTGTTGGTACTGCCTGA-MGB (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used as internal probe. To analyze the septin 9 transcript variants, total RNA was isolated using

RNeasy Mini Kit 50 (Cat# 74104 QIAGEN) and applied to reverse transcription using RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat#K1622 Fermentas). The cDNA was analyzed by qPCR using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Cat#204143 QIAGEN) and a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reaction parameters were 30 min at 50°C, 15 min at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. The triplicate mean values were calculated using GAPDH gene transcription as reference for normalization. Used qRT-PCR primers sequences are presented in primers sequences table.

### **siRNA, plasmids and transfection reagents**

siRNAs from septin 9 were a Stealth RNAi™ siRNA ( si1: Cat#SEPT9HSS173895, si3: Cat# SEPT9HSS173897) from Invitrogen and non-targeting siRNA (Cat#sc-37007) was from Santa Cruz. The sequences targeting septin 9 (si1 and si3) are presented in siRNA sequence table.

The cDNA of septin 9 variant 1 transcript within pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector (cDNA septin 9\_i1) was a gift from Dr Russell(CCRCB, Queens University Belfast). The pET21d vector was a gift from Dr. Pierre Nioche (INSERM UMR-S 1124, University of Paris Descartes).

cDNA septin 9\_i1 vector was used as a template to generate pcDNA V5 septin 9\_del1 using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Cat#200521) from agilent following the manufacturer's recommendations. Therefore the septin 9\_i1 V5/His tag and septin 9\_del1 V5/His sequences have been amplified by PCR from their pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector. The resulting DNA fragments have been inserted in a pET21d vector using In-Fusion® HD Cloning System Cat#639648 (Clontech) pET21d in-frame with the C-terminal 6-histidine coding sequence of the vector and according to manufacturer recommendations to obtain pET21d septin 9\_i1 V5/His and PET21d septin 9\_del1 V5/His. All the primers sequences were presented in primers sequences Table.

The cDNA of GFP-IpgD was a gift from Hélène Tronchère (INSERM UMR-S 1048, I2MC and Université Paul Sabatier).

The transfection of cDNA and siRNA were performed using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) and Lipofectamine  RNAiMAX reagent (Invitrogen) respectively following the manufacturer's protocol. The transfection was performed for 48 h unless indicated otherwise in the text.

### **Protein production and purification**

*Escherichia coli* BL21(DE3) Rosetta cells (#70953-3 Novagen) were transformed with pET21d septin 9\_i1 V5/His and PET21d septin 9\_dell V5/His plasmids and all culture media contained 100  g/mL ampicillin, 34  g/mL chloramphenicol. Cells from a single colony were used to seed an overnight 20 ml preculture of LB medium. 1 L LB medium cultures from these precultures were grown at 37 C with shaking to an optical density (OD<sub>600 nm</sub>) of 0.9. The temperature was brought down to 28 C and protein expression was then induced with 1mM Isopropyl  -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) from Sigma (Cat# I6758) for 4 hours. The cells were harvested by centrifugation and the pellet was stored at -80 C until used. The cell pellet was suspended in 15 mL of 50 mM sodium phosphate pH 7.4, 300 mM sodium chloride, 10% glycerol, 20 mM imidazole, 0.1% Triton X-100, and one protease inhibitor cocktail EDTA free tablet (Roche). Cell lysis was performed by sonication on ice and the cell lysate was clarified by centrifugation for 30 min at 4 C to 40000xg. After filtering the supernatant the protein was isolated on a 1 mL metal affinity column (HisTrap HP, GE Healthcare) pre equilibrated in 50 mM sodium phosphate pH 7.4, 300 mM sodium chloride, 10% glycerol, 20 mM imidazole and eluted with 50 mM sodium phosphate pH 7.4, 300 mM sodium chloride, 300 mM Imidazole. The fractions containing the protein of interest were further purified by cation exchange chromatography. The pooled fractions were diluted with a 1:5 ratio to a final solution of 30 mM tris pH8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and then

incubated with 1 mL of a strong cation exchange resin (Macro-Prep 25S, BioRad). The resin was packed in a column and eluted with a 100 to 600 mM NaCl linear gradient. Fractions containing the majority of protein were obtained around 350 mM NaCl. Septins were then flash-frozen and stored at -80°C.

### **Primary antibodies**

Anti septin 9 Cat#ab38314 (WB:1/500, IF:1/25), anti HCV core Cat#ab2740 (WB:1/1000, IF:1/100), anti  $\alpha$ tubulin Cat#ab15246 (WB:1/1000, IF:1/100), anti septin 2 Cat#ab88657(WB:1/500, IF:1/50), mouse and rabbit anti V5 tag Cat#ab27671 (WB:1/1000, IF:1/400), Cat#ab9116 (WB:1/1000, IF:1/400) respectively and anti ADFP/PLIN2 Cat#ab52355 (WB:1/2000, IF:1/100) were from abcam; anti  $\beta$ tubulin Cat# T4026 (WB:1/1000, IF:1/100) and anti TIP47/PLIN3 Cat#HPA006427 (WB:1/1000, IF:1/100) from Sigma-Aldrich; anti-Actin Cat#sc-1616 (WB:1/1000) and anti-PLIN2 Cat#sc-32450 (WB:1/250, IF:1/25), anti DGAT1 Cat#sc-32861 (IF:1/100) from Santa Cruz Biotechnology, anti HCV NSA Cat#HCM-131-5 (WB:1/1000, IF:1/100) from amsbio. The mouse antibody to HCV envelope protein E2 (WB:1/500) was a gift from Dr. Jean Dubuisson (CIIL, Lille , France).

### **Secondary antibodies and dyes**

Anti mouse IgG-HRP and anti rabbit IgG-HRP from GE health care (WB:1/1000). Anti-goat IgG-HRP Cat#sc-2020 (WB:1/1000) from Santa Cruz. Alexa Fluor® 633 Cat#A21136, A21070 and A21082 (IF:1/100), Alexa Fluor® 568 Cat#A11004, A11011 and A11057 (IF:1/100), Alexa Fluor® 488 Cat#A11001, A21206 and A21202 (IF:1/100), streptavidin Alexa-488 Cat#S32354 (IF:1/100), streptavidin Alexa-568 Cat#S11226 (IF:1/100). Actin was stained with Alexa Fluor® 594 phalloidin Cat#a12381 (IF:1/100) and nuclei with Hoechst Cat#H21486 (IF:1/5000), both are from Invitrogen. Lipophilic fluorescence dye LD 540

(IF:1/100) from Christoph Thiele (Bonn University , Germany), was used to stain lipid droplets.

### **GST-2XPHD preparation**

The GST (Glutathion S TRANSFERASE)-2XPHD probe was produced as previously described<sup>47</sup> in E.coli BL21 RIL<sup>+</sup> (Stratagene) and purified with glutathione Sepharose 4B (Amersham). The recombinant protein was biotinylated (Bio-GST-2XPHDING2) using the BiotinTag Micro biotinylation kit (Cat#BTAG-1KT Sigma-aldrich).

### **Immunofluorescence**

Cells were grown on coverslips, fixed with paraformaldehyde 4% for 20 min and permeabilized for 20 min at 37°C using the permeabilizing buffer (PFS): DPBScontaining saponin (Cat#10294440 Fisher scientific) 0.025% m.v<sup>-1</sup>, gelatin from cold water fish skin Cat#G7041 sigma 0.7 % m.v<sup>-1</sup>). Then cells were incubated with primary antibody for 2 h washed three times for 5 min with PFS and incubated with the appropriate secondary antibodies or with the dye for 90 min. The coverslips were mounted using Prolong Gold (Cat#P36934 Invitrogen). For PtdIns5P staining the cells on coverslips were fixed and permeabilized as described above and then incubated with recombinant Bio-GST-2XPHDING2 (prepared as describe above) in 1% BSA-PBS for one hour. Following incubation, cells were washed and incubated for another hour with streptavidin Alexa-488 (1/300) (Invitrogen) and Hoechst for nuclei staining, mounted and analyzed for immunofluorescence.

### **Images acquisition and analysis**

Images acquired with a Leica TCS SP5 AOBS tandem confocal microscope were analyzed by Icy bioimage analysis softwarefor 3D reconstruction. For colocalisation analysis, images were treated by ImageJ software, the plugin “Intensity Correlation Analysis” was used to generate

the Pearson's correlation coefficient ( $R_r$ ) which range from  $-1$  (perfect exclusion) to  $+1$  (perfect correlation).

To determine LD distribution in cells, the plugin “Radial profil” was used. For analysis, a circle was defined at the periphery of each cell and the plugin produces a profile plot of normalized integrated intensities around concentric circles as a function of distance from a point in the image, considered here as the centre of the cell. The concentric circles were assembled in three circle bands, the first corresponding to the area of the nuclei and the rest corresponding to the cytoplasm was divided in two equal bands (the band near the nuclei is considered as the “perinuclear” and the other the “periphery”. The intensity in each band was calculated from the total integrated intensities around concentric circles present in the band.

To calculate the size and number of LDs, images obtained by confocal microscopy were processed by background subtraction and standardized thresholding (default), cell ROI was made by free hand selection tool, then LDs size and number was obtained by ImageJ analyze particles function (particle area less than  $0.01 \mu\text{m}^2$  were excluded).

### **Immunoblot**

Cells were washed with ice cold DPBS and lysed on ice using the following buffer: 20 mM Tris, HCl, 100 mM NaCl, 1% Triton X100 at PH 7.4 containing protease inhibitors (cOmplete™ ULTRA Cat#05892970001 Roche). The proteins were separated on SDS (sodium dodecyl sulfate) polyacrylamide gel and electrotransferred onto nitrocellulose membrane. After transfer, the membrane was saturated in DPBS containing 0.1% Tween 20 and 5% milk. Primary antibodies were added overnight at  $4^\circ\text{C}$  or for 2 h at room temperature depending on the antibody. The membranes were washed with DPBS and incubated for 1 h at room temperature with appropriate secondary antibody coupled with peroxidase. ECL plus kit (Cat#32132 Thermo Scientific) was used for protein detection. Chemiluminescent signal was

detected by G:BOX Chemi Fluorescent & Chemiluminescent Imaging System from SYNGENE. Blot quantification was done using ImageJ software.

### **PIP strip overlay assay**

Membranes PIP Strips (Echelon Biosciences) were blocked with 3% BSA FFA dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 (3% BSA FFA PBS-T) at room temperature for 60 min, then incubated overnight at 4°C with the same buffer containing the purified protein of interest at a concentration of 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  or the purified corresponding tag (V5 or GST) at equivalent molar concentration used as controls. The membranes were washed and bounded proteins were detected with suitable antibody.

### **Neutral lipids analysis:**

This analysis was performed using the facility service of Metatoul in Toulouse (<http://www.metatoul.fr>). One million of cells were used for lipid extraction according to Bligh and Dyer <sup>68</sup>using dichloromethane/methanol/water (2.5 :2.5 :2.1, v/v/v) mix, in the presence of the internal standards : 4  $\mu\text{g}$  of stigmasterol, 4  $\mu\text{g}$  of glycerid dimyristoleate, 4  $\mu\text{g}$  of cholesteryl heptadecanoate, 8  $\mu\text{g}$  of glyceryl trinonadecanoate. Organic phases were collected and evaporated to dryness and neutral lipids were separated through a SPE cartridge. Briefly SiOH cartridge (200mg, Macherey Nagel) was equilibrated with 2 ml of dichloromethane and the lipid extract was put down in 20  $\mu\text{l}$  of a solution of dichloromethane containing 10% omethanol and loaded. Neutral lipids were eluted with 2 ml of the same mixture. The final extract were concentrated and dissolved in 20  $\mu\text{l}$  of ethyl acetate. 1 $\mu\text{l}$  of the lipid extract was analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using an Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5m X 0,32mm i.d, 0.50  $\mu\text{m}$  film thickness) <sup>69</sup>. The temperature of the Oven was programmed from 200°C to 350°C at a rate of 5°C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and the detector were at 315°C and 345°C respectively.

### **Membrane flotation assay**

The assay was performed as recently reported<sup>38</sup>. Huh7 cells treated with 100  $\mu$ M sodium oleate for 24 h were trypsinized, washed, and counted.  $15 \times 10^6$  cells total for each sample were resuspended in 1.75 ml PBS containing 0.25 M sucrose (PBS/sucrose) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma). The cells were then lysed with 200 passages in a tight fitting dounce homogenizer to ensure approximately 90% lysis. The cell lysate was then spun at  $2500 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  to pellet cellular debris and nuclei. Equal amounts of protein (2.5 mg) for each cell type was adjusted in volume to 1 ml with PBS/sucrose and mixed with 1 ml of 60% iodixanol (Sigma) resulting in a 30% iodixanol concentration. A discontinuous iodixanol gradient (10%, 20%) was layered on top of the lysate/iodixanol mixture, and the gradient was spun at  $200,000 \times g$  for 16 h at  $4^\circ\text{C}$  in a MLS 50 Rotor. A total of 25 fractions were collected from top to bottom. The fractions were mixed 1:1 with Laemmli buffer for immunoblot.

### **Transcriptome analysis**

Transcriptome dataset GSE14323<sup>32</sup> was downloaded from NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE14323>): normalized matrix by users (RMA method in the R affy package) was employed to realize analysis. This dataset is composed of 19 control samples of normal liver and 49 samples of cirrhosis. R software version 3.2.2 was employed to perform, principal component analysis, boxplots, heatmap, two-tailed Student *t*-test, also algorithm of random forest (RF). The learning machine application RF was performed by initializing the function tuneRF in order to determine the mtry parameter with the optimal error of bag. The algorithm was implemented with a learning based on 500 classification trees with the optimal mtry parameter previously determined<sup>70</sup>.

## Statistical analyses

Unpaired Student's t tests was used and statistical significance was determined at \*P <0.05; \*\*

P <0.001, \*\*\*P < 0.0001.

## Primers sequence table

Primer name	Sequences (5'-3')
Mutagenic primer	Forward : CATCCTGGAGCAGATGCAGGGCTTCGAGTTCA
	Reverse : TGAACTCGAAGCCCTGCATCTGCTCCAGGATG
Septin 9 PET21	Forward : CTCCGTCGACAAGCTATGAAGAAGTCTTACTCAGGAGG
	Reverse : GGTGGTGGTGGCTCGATCAATGGTGATGGTGATGAT
SEPT 9 for qRT-PCR	Forward : GTCCACTGCTGCCTCTACTTCA
	Reverse : GGACGATGTTGACCACCTTGCT
hG3PDH for qRT-PCR	Forward : AGCCACATCGCTCAGACAC
	Reverse : GCCCAATACGACCAAATCC
HCV	Forward :AGYGTGGGTYGCGAAAG
	Reverse : CACTCGCAAGCRCCT
Septin9_ i1	Forward : ATGAAGAAGTCTTACTCAGGAGG
	Reverse : TGGGCCACTGGAGTCACCAAGC
Septin 9 _i2	Forward : ATTCATTCAGCTGAGCCAGG
	Reverse : AGTCCGAAATGATCCCATCC
Septin 9 _i3	Forward : ATGGAGAGGGACCGGATCTCA
	Reverse : CTCGGAGTAGGGGAGTCTGG
Septin 9 _i4	Forward : GCTGGACTCTCTCGCTGACT
	Reverse : CCTGGACAGAGACTGAAGCC
Septin 9 _i5	Forward :AGAGGCCTCCGGAGGAAGAG
	Reverse : CCACCATGATGTTGAACT

## siRNA sequence table

siRNA	Sequences (5'-3')
si Septin 9 (SEPT9HSS173895) (si1)	Forward : AGGCGUACCGUGUGAAGCGCCUCAA
	Reverse : UUGAGGCGCUUCACACGGUACGCCU
si Septin 9 (SEPT9HSS173897) (si3)	Forward : GCCAUGAAGCAGGGCUUCGAGUUCA
	Reverse : UGAACUCGAAGCCCUGCUUCAUGGC

## REFERENCES

- Pol, A., Gross, S. P. & Parton, R. G. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol.***204**, 635–646 (2014).
- Welte, M. A. Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol. CB***25**, R470–481 (2015).
- Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.***81**, 687–714 (2012).
- Ohsaki, Y., Suzuki, M. & Fujimoto, T. Open questions in lipid droplet biology. *Chem. Biol.***21**, 86–96 (2014).
- Bickel, P. E., Tansey, J. T. & Welte, M. A. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta***1791**, 419–440 (2009).
- Straub, B. K. *et al.* Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc***23**, 480–492 (2010).
- Yamane, D., McGivern, D. R., Masaki, T. & Lemon, S. M. Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**, 263–288 (2013).
- Barba, G. *et al.* Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***94**, 1200–1205 (1997).
- Paul, D., Madan, V. & Bartenschlager, R. Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe***16**, 569–579 (2014).
- Miyinari, Y. *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.***9**, 1089–1097 (2007).
- Boulant, S. *et al.* Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.***281**, 22236–22247 (2006).
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. & Fujimoto, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.***277**, 44507–44512 (2002).
- Olofsson, S.-O. *et al.* Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim. Biophys. Acta***1791**, 448–458 (2009).
- Balla, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.***93**, 1019–1137 (2013).
- Maehama, T., Fukasawa, M., Date, T., Wakita, T. & Hanada, K. A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***440**, 150–156 (2013).
- Gassama-Diagne, A. *et al.* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.***8**, 963–970 (2006).
- Martin-Belmonte, F. *et al.* PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell***128**, 383–397 (2007).
- Awad, A. *et al.* SHIP2 regulates epithelial cell polarity through its lipid product, which binds to Dlg1, a pathway subverted by hepatitis C virus core protein. *Mol. Biol. Cell***24**, 2171–2185 (2013).
- Nishihama, R., Onishi, M. & Pringle, J. R. New Insights into the Phylogenetic Distribution and Evolutionary Origins of the Septins. *Biol. Chem.***392**, 681–687 (2011).
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P. & Barral, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***9**, 478–489 (2008).

21. Barral, Y. & Kinoshita, M. Structural insights shed light onto septin assemblies and function. *Curr. Opin. Cell Biol.***20**, 12–18 (2008).
22. Dolat, L., Hu, Q. & Spiliotis, E. T. Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biol. Chem.***395**, 123–141 (2014).
23. Fung, K. Y. Y., Dai, L. & Trimble, W. S. Cell and molecular biology of septins. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.***310**, 289–339 (2014).
24. Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***13**, 183–194 (2012).
25. Bertin, A. *et al.* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J. Mol. Biol.***404**, 711–731 (2010).
26. Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M. & Takiguchi, K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol. CB***19**, 140–145 (2009).
27. Zhang, J. *et al.* Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol. CB***9**, 1458–1467 (1999).
28. Volceanov, L. *et al.* Septins arrange F-actin-containing fibers on the Chlamydia trachomatis inclusion and are required for normal release of the inclusion by extrusion. *mBio***5**, e01802–01814 (2014).
29. Bridges, A. A. & Gladfelter, A. S. Fungal pathogens are platforms for discovering novel and conserved septin properties. *Curr. Opin. Microbiol.***20**, 42–48 (2014).
30. Kim, C. S., Seol, S. K., Song, O.-K., Park, J. H. & Jang, S. K. An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J. Virol.***81**, 3852–3865 (2007).
31. Dos Santos, A. *et al.* Identification of cellular targets in human intrahepatic cholangiocarcinoma using laser microdissection and accurate mass and time tag proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP***9**, 1991–2004 (2010).
32. Mas, V. R. *et al.* Genes Involved in Viral Carcinogenesis and Tumor Initiation in Hepatitis C Virus-Induced Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Med.***15**, 85–94 (2009).
33. Kim, M. S., Froese, C. D., Estey, M. P. & Trimble, W. S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.***195**, 815–826 (2011).
34. Wakita, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.***11**, 791–796 (2005).
35. Heid, H. W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H. R. & Keenan, T. W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.***294**, 309–321 (1998).
36. Pietschmann, T. *et al.* Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.***76**, 4008–4021 (2002).
37. Ploen, D. *et al.* TIP47 is associated with the hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles. *Eur. J. Cell Biol.***92**, 374–382 (2013).
38. Vogt, D. A. *et al.* Lipid Droplet-Binding Protein TIP47 Regulates Hepatitis C Virus RNA Replication through Interaction with the Viral NS5A Protein. *PLoS Pathog.***9**, (2013).
39. Yen, C.-L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C. & Farese, R. V. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.***49**, 2283–2301 (2008).
40. Herker, E. *et al.* Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.***16**, 1295–1298 (2010).
41. Camus, G. *et al.* Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J. Biol. Chem.***288**, 9915–9923 (2013).
42. Thiam, A. R., Farese, R. V. & Walther, T. C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***14**, 775–786 (2013).
43. Boström, P. *et al.* Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***25**, 1945–1951 (2005).
44. Sellin, M. E., Stenmark, S. & Gullberg, M. Mammalian SEPT9 isoforms direct microtubule-dependent arrangements of septin core heteromers. *Mol. Biol. Cell***23**, 4242–4255 (2012).
45. Yang, H., Galea, A., Sytnyk, V. & Crossley, M. Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr. Opin. Cell Biol.***24**, 509–516 (2012).
46. Gozani, O. *et al.* The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell***114**, 99–111 (2003).
47. Coronas, S. *et al.* Elevated levels of PtdIns5P in NPM-ALK transformed cells: implication of PIKfyve. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***372**, 351–355 (2008).
48. Niebuhr, K. *et al.* Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.***21**, 5069–5078 (2002).
49. Sbrissa, D., Ikononov, O. C., Filios, C., Delvecchio, K. & Shisheva, A. Functional dissociation between PIKfyve-synthesized PtdIns5P and PtdIns(3,5)P2 by means of the PIKfyve inhibitor YM201636. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.***303**, C436–446 (2012).

50. Casamayor, A. & Snyder, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2762–2777 (2003).
51. Mostowy, S. *et al.* Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe* **8**, 433–444 (2010).
52. Phan, Q. T. *et al.* Role of endothelial cell septin 7 in the endocytosis of *Candida albicans*. *mBio* **4**, e00542–00513 (2013).
53. Gong, J., Sun, Z. & Li, P. CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 121–126 (2009).
54. Wu, L. *et al.* Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth. *Dev. Cell* **30**, 378–393 (2014).
55. Guijas, C., Rodríguez, J. P., Rubio, J. M., Balboa, M. A. & Balsinde, J. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 1661–1671 (2014).
56. Andersson, L. *et al.* PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *J. Cell Sci.* **119**, 2246–2257 (2006).
57. Boström, P. *et al.* SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1286–1293 (2007).
58. Foti, M., Audhya, A. & Emr, S. D. Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2396–2411 (2001).
59. Ren, J. *et al.* A phosphatidylinositol transfer protein integrates phosphoinositide signaling with lipid droplet metabolism to regulate a developmental program of nutrient stress-induced membrane biogenesis. *Mol. Biol. Cell* **25**, 712–727 (2014).
60. Sarkes, D. & Rameh, L. E. A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *Biochem. J.* **428**, 375–384 (2010).
61. Viaud, J., Boal, F., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F. & Payrastra, B. Phosphatidylinositol 5-phosphate: a nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **36**, 260–272 (2014).
62. Ikonomov, O. C. *et al.* Kinesin adapter JLP links PIKfyve to microtubule-based endosome-to-trans-Golgi network traffic of furin. *J. Biol. Chem.* **284**, 3750–3761 (2009).
63. Bartz, R. *et al.* Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res.* **6**, 3256–3265 (2007).
64. Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid droplet biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**, 39–45 (2014).
65. Barbosa, A. D., Savage, D. B. & Siniosoglou, S. Lipid droplet-organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 91–97 (2015).
66. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
67. Tian, Y. *et al.* Differential modulation of L-type calcium channel subunits by oleate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294**, E1178–E1186 (2008).
68. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
69. Barrans, A. *et al.* Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J. Biol. Chem.* **269**, 11572–11577 (1994).
70. Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* **45**, 5–32 (2001).

## ACKNOWLEDGEMENTS

A.A. was supported by a fellowship of RII Pasteur, University of Paris XI and CHB association. CG was supported by a grant from ANRS. This work was supported by a grant from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC/SUBV/CKLQ6) to AGD. We thank T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) for providing the pJFH1 plasmid, C. Rice (Rockefeller University, New York, NY) for the Huh-7.5 cell line and H. Russell (Queen University, Belfast, UK.) for providing septin 9\_i1 construct. We also

thank C. Comera (INRA, UMR1331, Toulouse) for advices on lipid staining and Christopher Thiele (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden) for providing the LD450 Dye and all the members of the INSERM 1193 for helpful discussions. We thank A. Jalil and E. Perret from the imagery services at IGR (Villejuif) and Institut Pasteur (Paris) We thank Justine Bertrand-Michel (Metatoul platform, Toulouse, France) for lipids analysis.

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1: Transcriptomic analysis of septin 9 in human cirrhosis.**

(a) R software was used to generate boxplot presents septin9 expression in cirrhosis and in normal liver samples of GSE14323 dataset and to calculate mentioned p-value of two.tailed Student's *t*-test. (b) The octameric complex of septins contains septin 2 group and septin 6 group members, septin 7 and septin 9 which caps the two extremities of the rod shaped complex. (c) R software with FactoMineR package was used to obtain unsupervised principal component analysis performed on GSE14323 with septin molecules: p-value obtained on first principal axis allowed discriminating normal liver from cirrhosis in GSE14323. (d) Mean Decrease Accuracy of predict variables during the "Septin" Random Forest learning machine. (e) R software was used to generate boxplot of septins allows to discriminate cirrhosis from normal liver with GSE14323 and to calculate mentioned p-value of two.tailed Student's *t*-test. (f) R software was used to perform heatmap by unsupervised classification with septin molecules in GSE14323 (classification tree with Euclidean distance and complete linkage).

### **Figure 2: Septin 9 increases in JFH-1 infected cells and regulates septin 2 and microtubules filaments.**

(a) Immunoblot of septin 9 and core in Huh7.5 cells infected or not with JFH-1 for 24, 48 and 72 h. Actin was used as a loading control. The bar graph presents the densitometry analysis of the immunoblots from 3 independent experiments. (b) Huh7.5 cells transfected with non-targeting (control) or septin 9 siRNA (si3) for 24 h then infected or not with HCV JFH-1 for

72 h then stained for septin 9 (green) and core (red). (c) Immunoblot of septin 9 and core in Huh7.5 cells transfected with non-targeting (control) or septin 9 siRNA (si1 or si3) then infected with HCV JFH-1 for 72 h. (d) Huh7.5 treated as in (b) and stained for septin 9 (green) and septin 2 (red). (e) Dot rectangles in panel (d) are presented in higher magnification. (f) Bar graph shows Pearson's correlation coefficient (Rr) of septin 9 and septin 2 calculated in 30 cells from 2 independent experiments. (g) Immunoblot of septin 2, septin 9 and core in Huh7.5 cells treated as described in (b). Actin was used as a loading control. Bar graph presents septin 2 expression from 3 independent experiments. (h) Huh7.5 cells were treated as described in (b) and stained for microtubules (MTs) with  $\beta$  tubulin (red) and septin 9 (green). (i) Dot squares in panel (h) present in higher magnification. (j) Bar graph shows Pearson's correlation coefficient (Rr) analysis of septin 9 and MTs calculated in 30 cells from 2 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.0001. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 3: Septin 9 regulates HCV-induced LDs accumulation, core recruitment on LDs and HCV replication.**

(a) Huh7.5 cells were transfected with non-targeting (control or Ctrl) or septin 9 siRNA (si3) for 24 h then infected with JFH-1 for further 72 h and stained for core (green) and LDs (red). (b) LDs fluorescence intensity in 30 cells from 2 experiments performed as described in (a). (c) Dot squares in panel (a) are presented in higher magnification. The right panels present green, red, line profile blots of the pink lines. (d) Bar graphs show Pearson's correlation coefficient (Rr) for colocalization between core and LDs of 30 cells from 2 experiments. (e) Representation of the peripheral (black) and perinuclear (red) regions of the cell. (f) Radial profile plots showing LD distribution between the peripheral (black) and the perinuclear regions (red) of cells indicated with the white arrows in panel (a). (g) Quantification of LDs in perinuclear and peripheral regions in 30 cells from 2 independent experiments performed as

described in (a). (h) LD size (left) and LD number (right) in 30 cells from 2 independent experiments done as described in (a). (i) Huh7.5 cells were transfected with non-targeting (control) or septin 9 siRNA (si3) for 24 h and infected with JFH-1 as in (a) for 72 h. Cells were analyzed for septin 9 mRNA and HCV RNA level by qRT-PCR. Bar graphs show results from 3 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001, \*\*\**P* < 0.0001. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 4: Septin 9 regulates TAG and DAG levels in Huh7R cells.**

(a) Huh7R cells transfected with empty vector (EV) or septin 9\_i1 for 48 h were stained for LDs (red) and V5 tag (green). Cells transfected with non-targeting (control) or septin 9 siRNA (si3) for 48 h were stained for LDs (red) and septin 9 (green). (b) Schematic representation shows the perinuclear and peripheral regions of the cell. Bar graphs represent LDs intensity in the perinuclear and peripheral region of 36 cells from 5 independent experiments. (c) LD size and LD number in 36 cells from 5 independent experiments. (d-f) Huh7R cells were transfected with either EV or septin 9\_i1 cDNAs then analyzed for triacylglycerol (TAG) and diacylglycerol (DAG). (d) Data represent nmol per 10<sup>6</sup> cells. (e) Ratio of TAG to DAG. (f) Distribution of fatty acid species in TAG and DAG according to carbon number in the acyl group. Results are obtained from 3 independent experiments. (g-i) Huh7R cells transfected with non-targeting or septin 9 siRNA for 72 h were analyzed for TAG and DAG as in (d-f). (m) Staining for V5 tag (red) and diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) (green) in Huh7R cells transfected with EV or septin 9\_i1. White squares indicate the area shown in higher magnification. Bar graph represents DGAT1 fluorescence intensity in 50 cells from 2 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.0001. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 5: Septin 9 regulates LDs in microtubules dependent manner.**

(a) Huh7R cells transfected with septin 9<sub>i1</sub> were treated with nocodazole (33  $\mu$ M) for 2 h at 37°C and placed on ice for 1 h. Then cells were washed 5 times with ice-cold culture medium to remove the nocodazole and moved at 37°C for indicated time in the figure before staining for V5 tag (green), LDs (red) and microtubules (gray) with  $\beta$  tubulin. (b) Schematic representation shows the perinuclear and peripheral regions. (c) Percentage of LDs intensity in the perinuclear and peripheral regions of 20 cells from 2 independent experiments. (d) LD size analyzed in 20 cells from 2 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001, \*\*\**P* < 0.0001. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 6: Mono phosphate phosphoinositides regulate LDs size.**

(a) PIP strip overlay assay: PIP strips were incubated either with Glutathion-S-transferase (GST) used as a negative control or with purified Septin 9\_V3 GST tagged at 0.5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> and analyzed with anti GST antibody. LPA, lysophosphatidic acid, LPC, lysophosphocholine, PtdIns, phosphatidylinositol, PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, PA, phosphatidic acid, PS, phosphatidylserine, PE, phosphatidylethanolamine, PC, phosphatidylcholine, S1P, sphingosine 1-phosphate. (b) Huh7R cells were treated with PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P or PtdIns (4, 5) P<sub>2</sub> at 30  $\mu$ M for 15 min prior to fixing and staining for septin 9 (green) and LDs (red). The dot squares indicate the zoom area. (c) Bar graph shows the LD size in Huh7R cells treated as described in (b). The results were obtained from at least 20 cells for each treatment from three independent experiments. (d) Huh7R cells were transfected with IpgD-GFP construct or not (control) for 48 h and stained for LDs (red). Bar graph represents LDs size measured in 15 cells from 2 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \*\**P* < 0.001, \*\*\**P* < 0.0001. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 7: Huh7R treatment with YM201636 causes decrease of LDs size and disrupts septin 9 and microtubules filaments.**

(a) Huh7R cells treated or not with YM201636 were stained for PtdIns5P (PHD) (green). Dot yellow squares indicate the zoomed area shown in 2D image with a black background and in 3D reconstruction images with white background. Bar graph shows PtdIns5P fluorescence intensity analysis of at least in 60 cells from 3 independent experiments. (b) Huh7R cells were transfected with either EV or septin 9\_i1 then treated with YM201636 and stained for V5 tag (green) and LDs (red). The dot squares indicate the zoomed area shown in a 2D image with a black background, and to the right is a 3D reconstruction image with a gray background. Arrows indicated the area present below at a higher magnification. Bar graph shows LD size in 30 cells from 3 experiments. (c) Huh7R cells transfected with septin 9\_i1 and treated with YM201636 were stained for V5 tag (green) and microtubules (red) with  $\beta$  tubulin. The dot squares indicate the zoomed areas shown as a 2D images with a black background, and to the right is a 3D reconstruction image with a gray background and longitudinal section (right down). Pearson's Correlation coefficient (Rr) for septin and microtubules was calculated from 20 cells from 3 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ . Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 8: Deletion of septin 9/PIs interaction domain disturbs localization of septin 9 with microtubules and affects LDs accumulation.**

(a) Septin 9 domain organization: the polybasic domain is located at N-terminal of GTP-binding domain, which is recognized by three motifs G1 (GXXXXGK=G<sup>305</sup>QSGLGK<sup>311</sup>), G3 (DXXG=D<sup>362</sup>TPG<sup>365</sup>), G4 (XKXD=A<sup>444</sup>KAD<sup>447</sup>). Down: Septin 9\_i1 and Septin9\_del1 sequence in the polybasic domain region. The boxed sequence (<sup>289</sup>RRKAMK<sup>294</sup>) has been deleted in Septin 9\_del1. (b) Coomassie blue stained SDS-PAGE gel of purified Septin 9\_i1 and Septin 9\_del1. (c) Immunoblot analysis of purified Septin 9\_i1 and Septin 9\_del1. (d) PIP strip overlay assay for V5tag, purified Septin 9\_i1 and Septin 9\_del1 performed as in figure 6a. Lipid-bound V5 fusion proteins were detected with antiV5 antibody. (e) Left: Huh7R cells

were transfected either with EV or septin9\_i1 or septin9\_del1 and stained for V5 tag (green) and LDs (red). Right: Radial profile plots of the presented cells show LDs intensity distribution in the peripheral and perinuclear regions. (f) LDs intensity in the perinuclear and peripheral regions of 36 cells from 5 independent experiments performed as described in (e). (g) LD size and LD number in 36 cells from 5 independent experiments done as described in (e). (h) Staining of V5 tag (green) and microtubules (MTs) with  $\beta$  tubulin (red) in Huh7R cells transfected with septin 9\_i1 or septin 9 del1. The Pearson's correlation coefficient (Rr) measured in 30 cells from 2 independent experiments is presented on the merge panels. The right panels are green, red, line profile blots of the pink lines. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ . Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 9: Sodium oleate treatment increases septin 9 and LDs in the perinuclear region and in LD-rich fractions.**

(a) Huh7 cells were incubated with culture medium supplemented with 0, 50, 100 or 200  $\mu$ M sodium oleate complex for 24 h then stained for septin 9 (green) and LDs (red). The white squares indicate the zoomed area shown as a 3D reconstruction image with a white background. (b) Immunoblot analysis of septin 9 and PLIN2 in cells treated as in (a). Bar graphs below show the analysis from 3 independent experiments. (c) Huh7 cells were treated or not with sodium oleate at 100  $\mu$ M were submitted to membrane flotation assay and analyzed by western blot for septin9, septin 2, PLIN2 and Calnexin. (d) Densitometry analysis of protein expression profile from western blot in (c) is shown. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ . Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure 10: Septine 9, PtdIns(5)P and their interaction are required for LDs accumulation in Huh7 sodium oleate treated cells.**

(a) Huh7 cells transfected with EV, septin 9\_i1, or septin 9\_del1 and treated with 100  $\mu$ M sodium oleate complex were strained for LDs and V5 tag. Dot squares indicates the zoom area shown below in 3D reconstruction images. Bar graph shows LD size analysis of 33 cells from 2 independent experiments. (b) Huh7 cells transfected with non-targeting (control) or septin 9 siRNA (si3) were treated with 100  $\mu$ M sodium oleate complex then strained for LDs and V5 tag. Bar graph shows LD size analysis of 30 cells from 2 independent experiments. (c) Huh7 cells treated with 100  $\mu$ M sodium oleate then with 160  $\mu$ M YM201636 for 1 h prior to staining for LDs (red). Bar graphs present mean LD size of 60 cells from 2 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ . Scale bar, 10  $\mu$ m. (d) Proposed model: HCV infection, oleic acid treatment and IpgD, the virulence factor of *Shigella flexneri* may increase the cellular level of both septin 9 and PtdIns5P promoting their interaction and the subsequent organization of MTs to control LD growth and accumulation.

## **SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS**

### **Figure S1: Deregulation of septins in human cirrhosis.**

(a) R software with Random Forest package was used to obtain class error by “Septin” random forest learning machine on the basis of 500 trees. (b) MDS plot of individual separation by “Septin” random forest. (c) Matrix of confusion obtained on “Septin” Random Forest.

### **Figure S2: Microtubules network in HCV infected cells.**

(a) Huh7.5 cells were infected or not with JFH-1 for 72 h then stained for microtubules with  $\alpha$  tubulin (green) and core (red). Scale bar, 10  $\mu$ m. (b) Huh7.5 cells were infected with JFH-1 for 48 h prior to mRNA extraction and septin 9 variants (1-5) mRNA were analyzed by qRT-PCR.

### **Figure S3: Septin 9 depletion decreases PLIN2 and its colocalization with core.**

Huh7.5 cells were transfected with non-targeting (control) or septin 9 siRNA si3 for 24 h then infected or not with JFH-1 for further 48 h prior to staining for PLIN2 (green) and core (red). Dot squares are presented in higher magnification below each panel. Scale bar, 10  $\mu$ m. Bar graph represents Pearson's correlation coefficient (Rr) analysis of septin 9 and PLIN2 calculated in 20 cells from 2 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \*\**P* < 0.001.

**Figure S4: Septin 9 regulates core and E2 expression as well as the LD size and distribution in Huh7R cells.**

(a) Immunoblot analysis of core and E2 in Huh7R cells transfected either with 75 or 100 pmol of septin 9 siRNA si3 or with 100 pmol non-targeting (control). The bar graph presents the densitometry analysis of 3 independent experiments. (b) Immunoblot analysis of core and E2 in Huh7R cells transfected with either EV or septin 9\_i1 for 48 h. The bar graph presents immunoblots analysis from 3 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001.

**Figure S5: Septin 9\_i1 colocalizes with endogenous septin 9 and septin 2 in filaments and it regulates PLIN3 and NS5A expression.**

(a) Huh7R cells were transfected with empty vector (EV) or septin 9\_i1 and stained for V5 tag (red) with endogenous septin 9 (green) or with septin 2 (green). (b) Immunoblot analysis of cells in (a). Bar graphs present the densitometry analysis of detected V5 tag, septin 9 and septin 2 in 3 independent experiments. (c) Huh7R cells transfected with either empty vector or septin 9\_i1 were stained for PLIN3 (green) with V5 tag or with NS5A (red). (d) Immunoblot of NS5A and PLIN3 in Huh7R cells transfected with either empty vector or septin 9\_i1. Bar graph presents the densitometry analysis of PLIN3 and NS5A in the immunoblots from 3 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \**P* < 0.05. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure S6: Effects of exogenous PtdIns5P or IpgD-GFP transfection on PtdIns5P intracellular levels.**

(a) Huh7R cells were untreated or treated with, PtdIns5P at 30  $\mu$ M for 15 min and stained for PtdIns5P (PHD) (green) and LDs (red). The dot squares indicate the zoom area shown below in higher magnification in 3D reconstruction images. (b) PtdIns5P fluorescence intensity analysis in 60 cells from 3 independent experiments. (c) LD size analysis of 40 cells from 3 independent experiments. (d) Huh7R cells were transfected with IpgD-GFP construct for 48 h and stained for (PHD) (red). Bar graph shows the PtdIns5P fluorescence intensity analysis of 30 cells from 2 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$ . Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure S7: YM201636 treatment decreases TAG levels in Huh7R cells.**

(a) Huh7R cells were transfected with either EV or septin 9\_i1 then treated with YM201636 and stained for V5 tag (green) and LDs (red). The dot squares indicate the zoomed area. Scale bar, 10  $\mu$ m. (b-d) Huh7R cells were transfected with septin 9\_i1 then treated or not with YM201636 for analyzing neutral lipids. (b) Bar graph shows triacylglycerol (TAG) and diacylglycerol (DAG) quantities in nmol per 10<sup>6</sup> cells. (c) Ratio of TAG to DAG. (d) Distribution of TAG and DAG fatty acid species according to carbon number in the acyl group. Results were obtained from 3 independent experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \* $P < 0.05$ .

**Figure S8: PtdIns5P partially rescues LDs clustering and microtubules (MTs) filamentous structure disturbed by depletion of septin 9.**

Huh7R cells were transfected with non-targeting or septin 9 siRNA and treated or untreated with PtdIns5P and stained for MTs with  $\beta$  tubulin (green) and LDs (red). The dot squares indicate the zoomed area. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure S9: PtdIns5P increases by HCV and septin 9 expression.**

(a) Huh7.5 cells were infected or not with JFH-1 for 72 h then fixed and stained for PtdIns5P (PHD) (green) and core (red). The dot yellow rectangles indicate the zoomed area presented at the right in 3D reconstruction images with a gray background. (b) Huh7, Huh7R and Huh7R transfected with septin 9\_i1 were fixed and stained for PtdIns5P (PHD) (green) and LDs (red). The dot yellow rectangles indicate the zoomed area presented at the right in 3D reconstruction images with a gray background. (c) PtdIns5P fluorescence intensity measured in 60 cells from 3 independent experiments for each condition. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \*\*\* $P < 0.0001$ . Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure S10: Effects of septin 9 and PtdIns5P on LDs growth in naïve Huh7 cells.**

(a) Huh7 cells transfected with either empty vector (EV) or septin 9\_i1 were stained for LDs (red) and V5 tag (green). Dot yellow squares indicate the zoomed area presented below in 3D reconstruction images. (b) LD size analyzed in 10 cells from 2 independent experiments. (c) TAG and DAG quantities in nmol per 10<sup>6</sup> cells for cells in (a). (d) Ratio of TAG to DAG. (e) Huh7 cells were transfected with IpgD-GFP for 48 h or not (control) and stained for LDs (red). (f) LD size analyzed in 10 cells from 2 independent experiments. (g) Huh7 cells were treated or not with PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P or PtdIns(4, 5)P<sub>2</sub> at 30  $\mu$ M for 15 min and stained for septin 9 (green) and LDs (red). The arrows indicate the zoomed area shown in dot squares. (h) Huh7 cells were transfected respectively with EV, septin 9\_i1 treated or not with YM201636 and septin 9\_del1 then stained for V5 tag (green) and LDs (red). The dot squares indicate the zoomed area shown to right in a 3D reconstruction image. Bar graph shows LD size in 10 cells from 2 experiments. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ . Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure S11: YM201636 treatment and Septin 9 polybasic domain deletion affect septin 9, microtubules and actin filaments structure in naïve Huh7 cells.**

(a,b) Naïve Huh7 septin 9\_i1 transfected cells treated or not with YM201636 (a) and naïve Huh7 cells transfected with septin 9\_del1 (b) were stained for V5 tag (red) and microtubules (MTs) with  $\beta$  tubulin (green). The dot squares indicate the zoomed areas shown as a 2D images with a black background, and to the right is a 3D reconstruction image with a gray background. (c) Pearson's correlation coefficient (Rr) measured in 10 cells for each experiment. (d) Naïve Huh7 cells transfected with empty vector, septin 9\_i1 and septin 9\_del1 constructs were stained for V5 tag (green) and actin (red). The dot squares indicate the zoomed areas shown. Values are means $\pm$ s.e.m. Student's *t*-test was used. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Figure S12: Neutral lipids analysis in naive Huh7 cells treated with sodium oleate.**

Huh7 cells were incubated with culture media supplemented with sodium oleate-BSA complex at 0, 100, 200  $\mu$ M for 24 h prior to analysis for neutral lipids. (a) TAG and DAG quantities (nmol per  $10^6$  cells). (b) Ratio of TAG to DAG. (c) Distribution of TAG, DAG species according to the carbon number in the acyl group. Results obtained from 2 independents experiments.



Figure 1

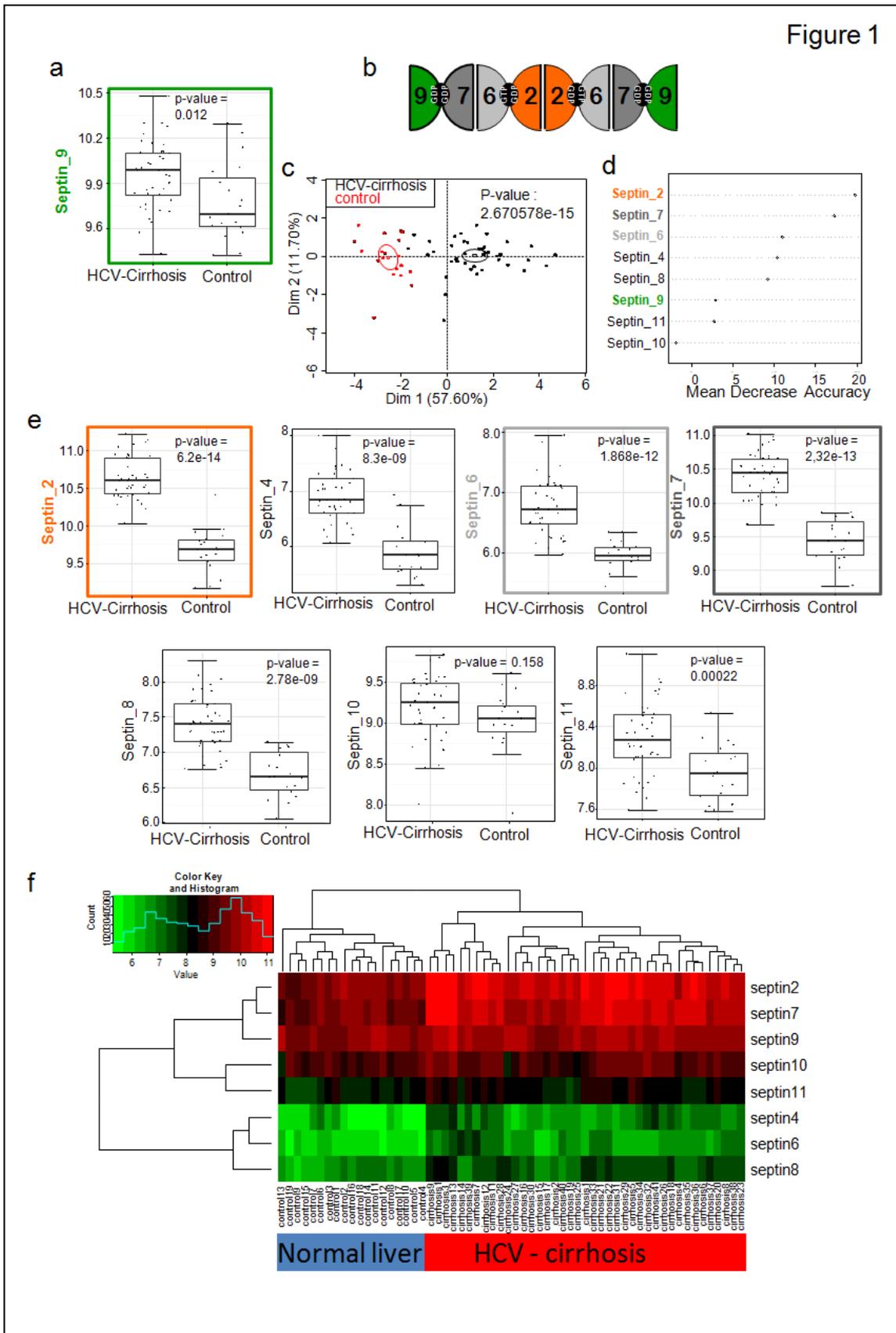


Figure 2

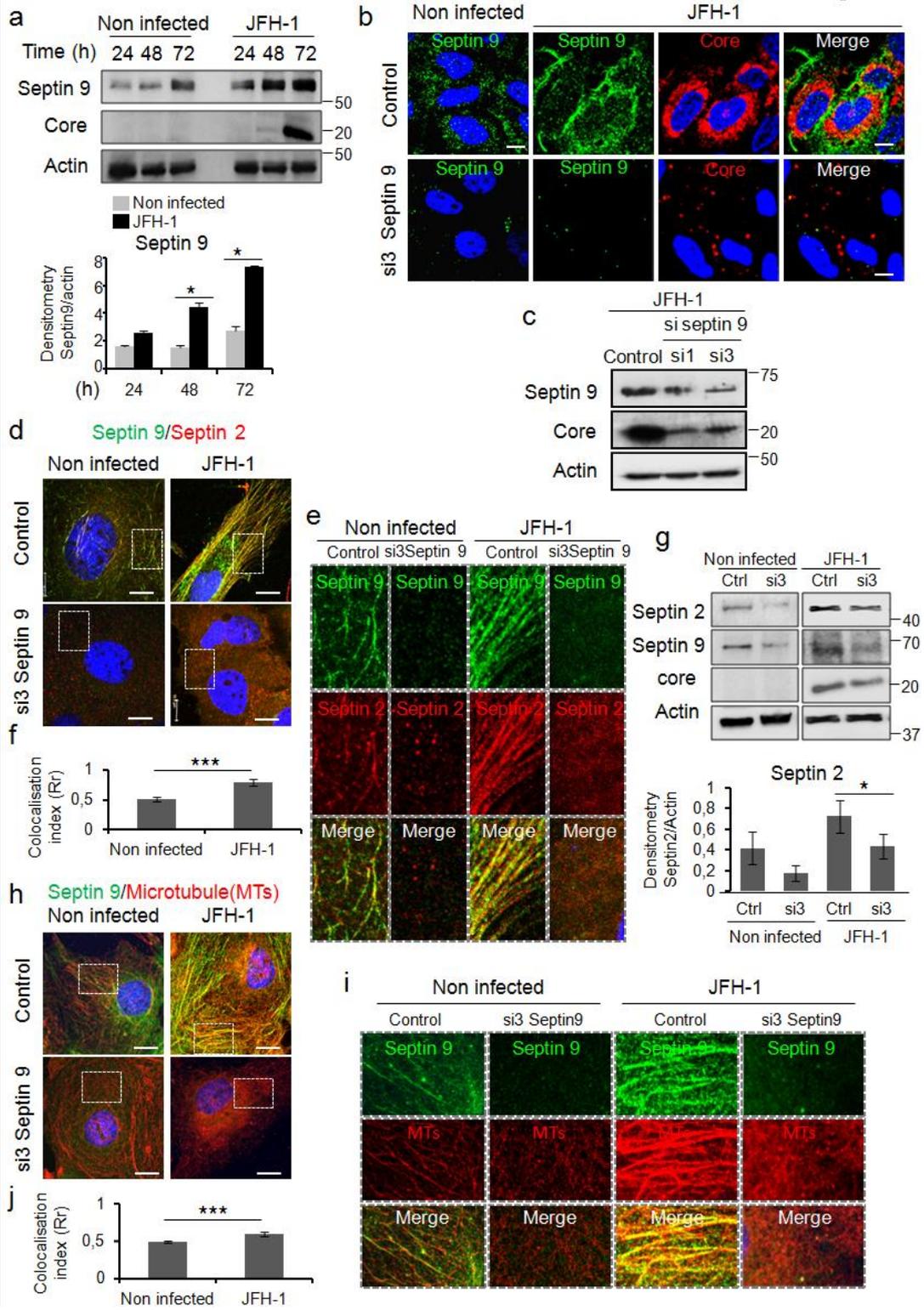
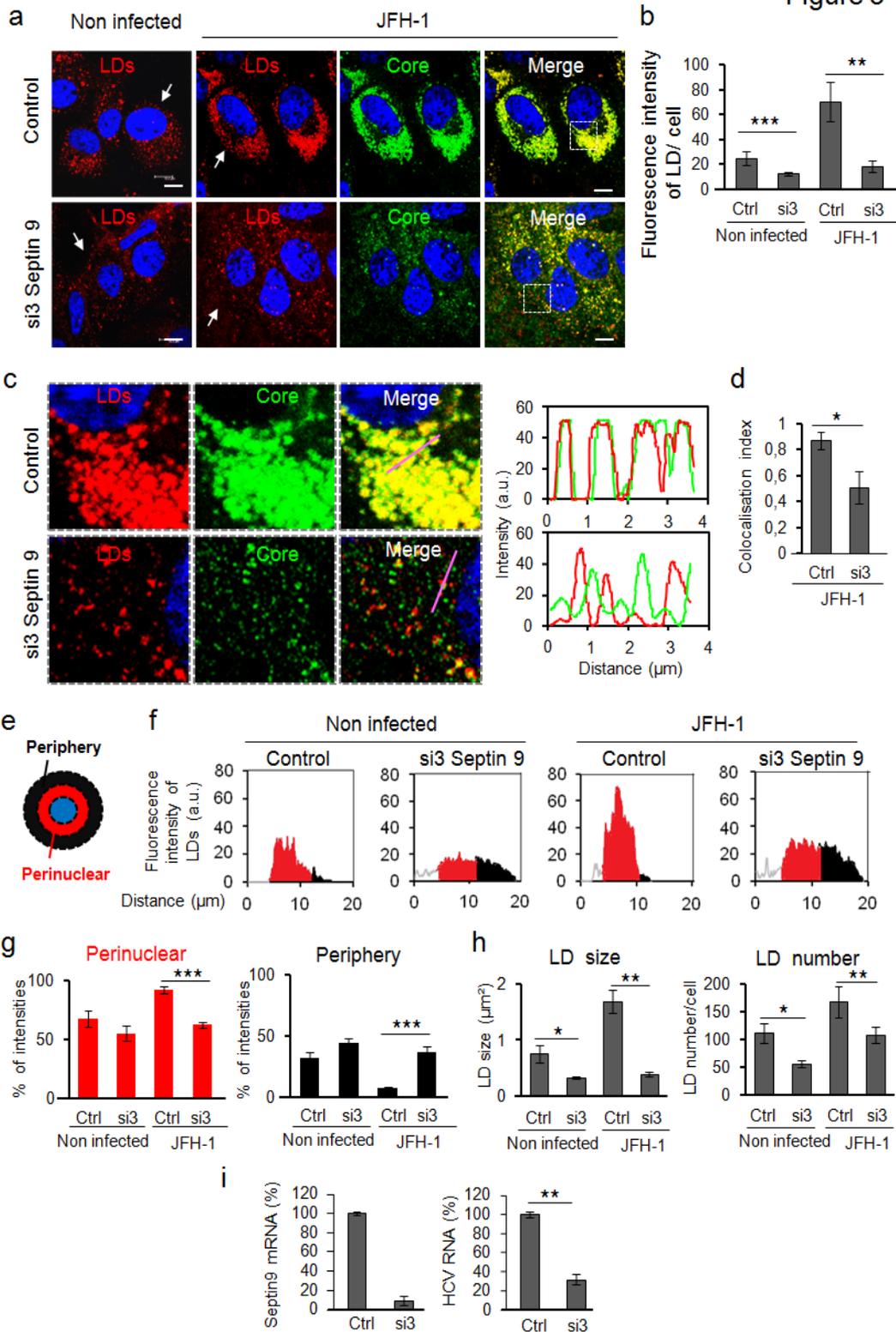


Figure 3



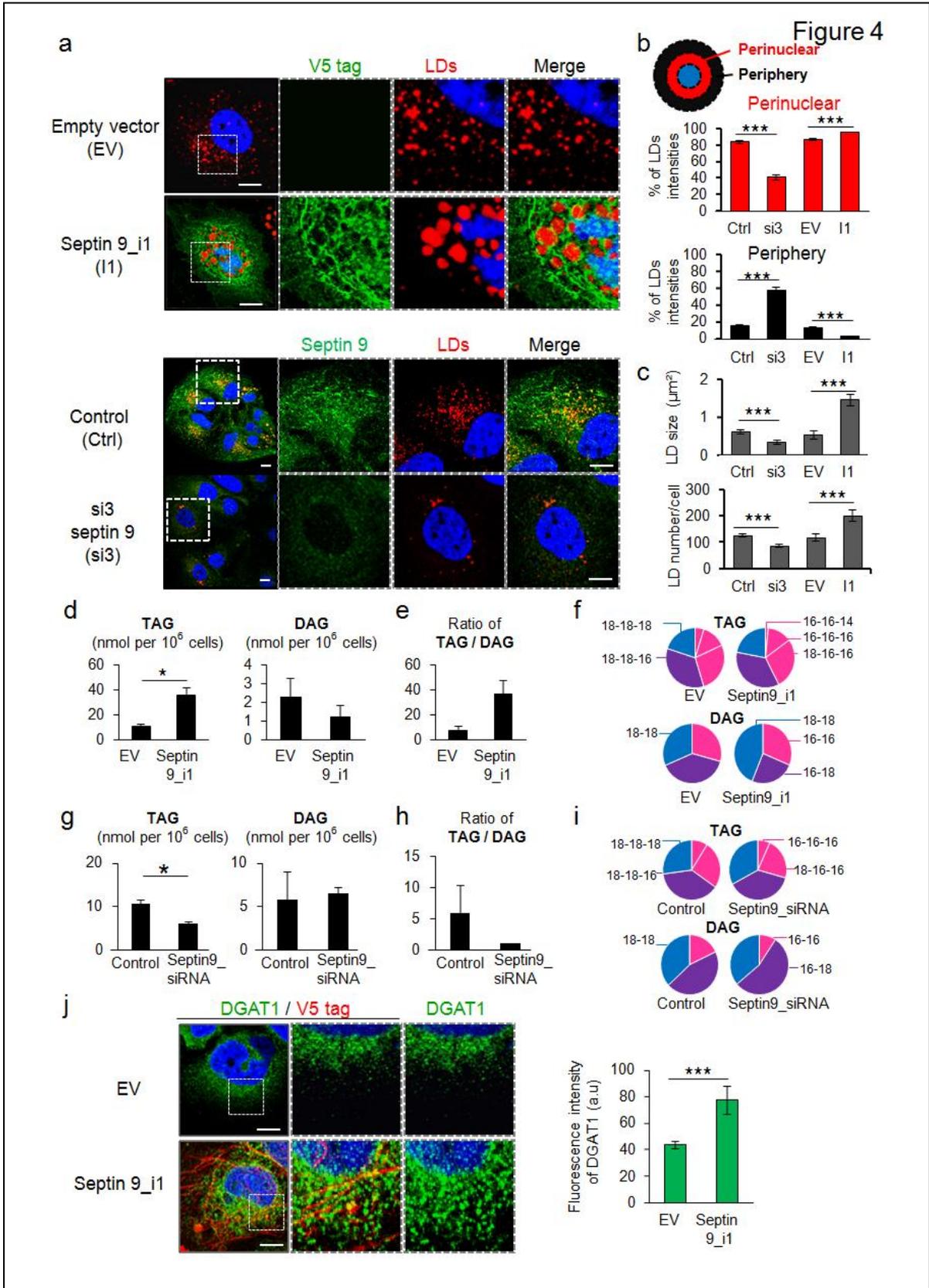


Figure 5

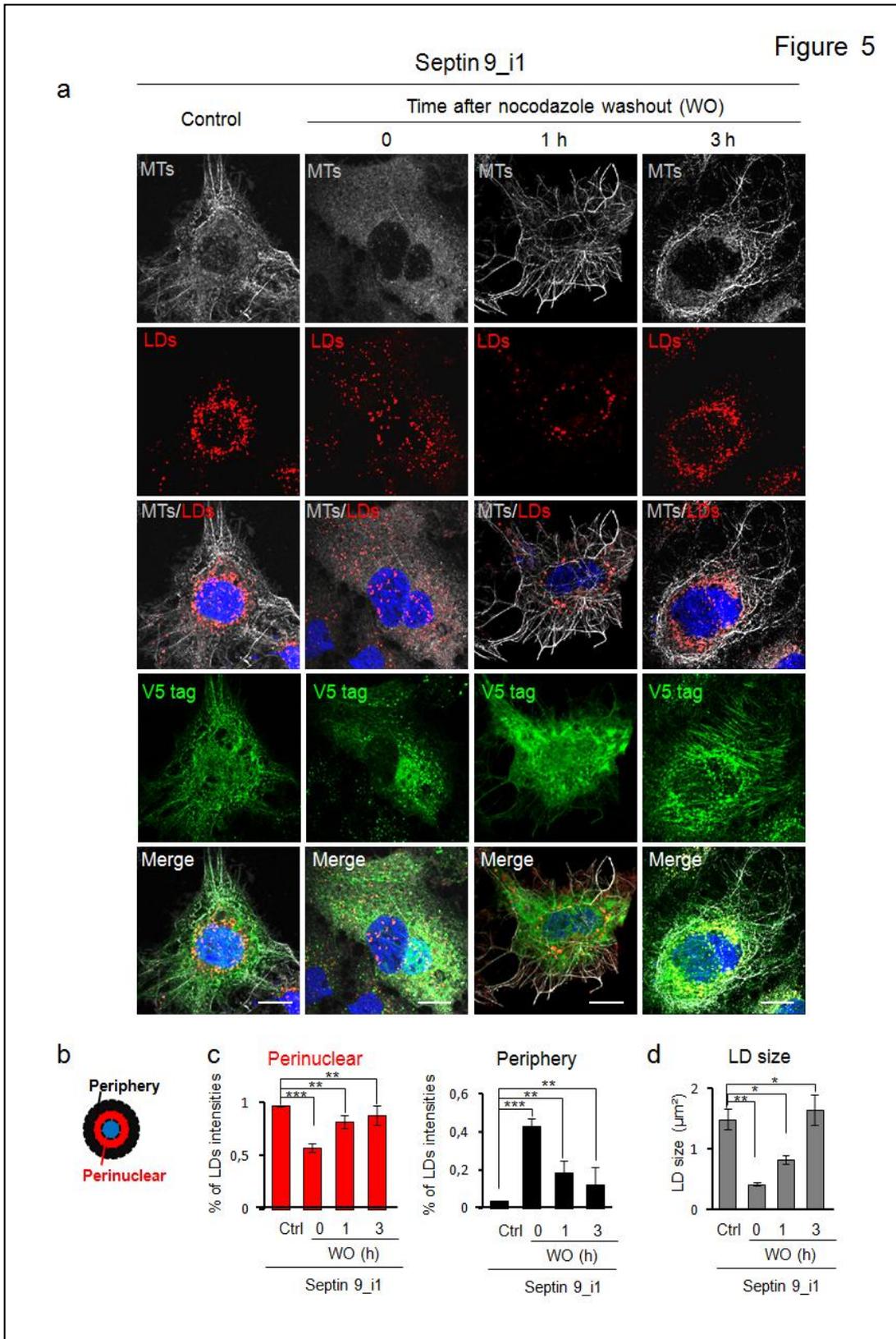


Figure 6

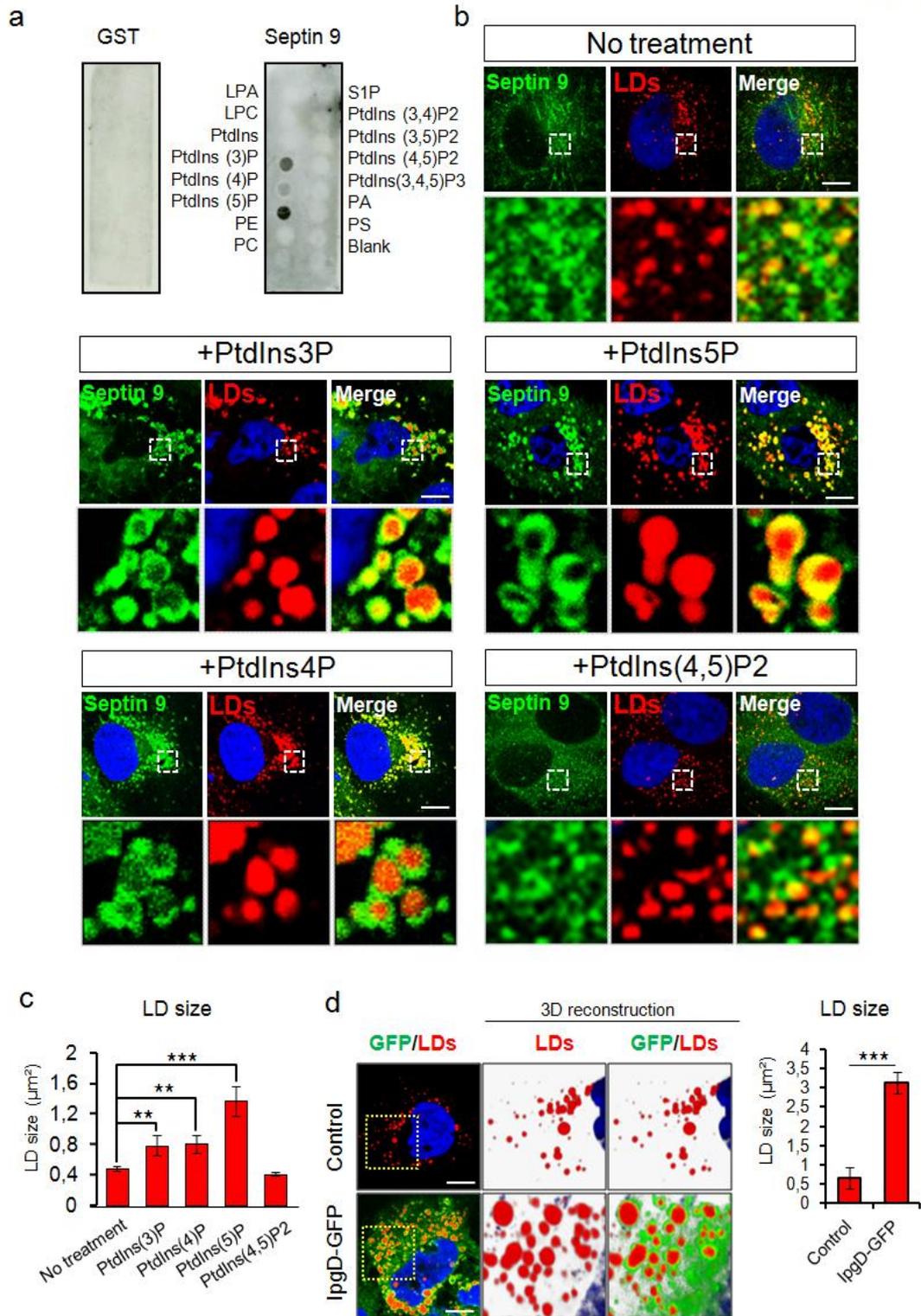


Figure 7

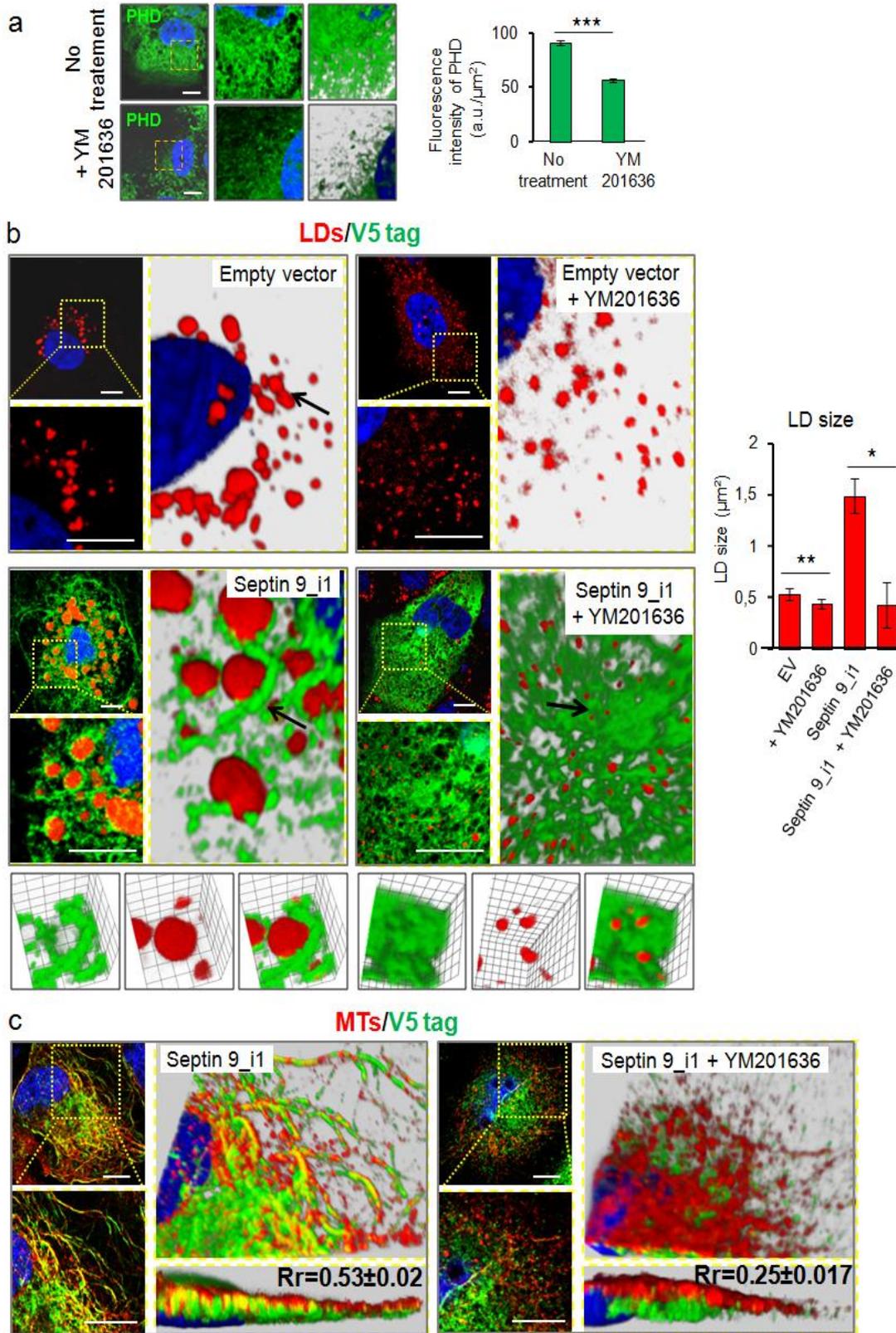
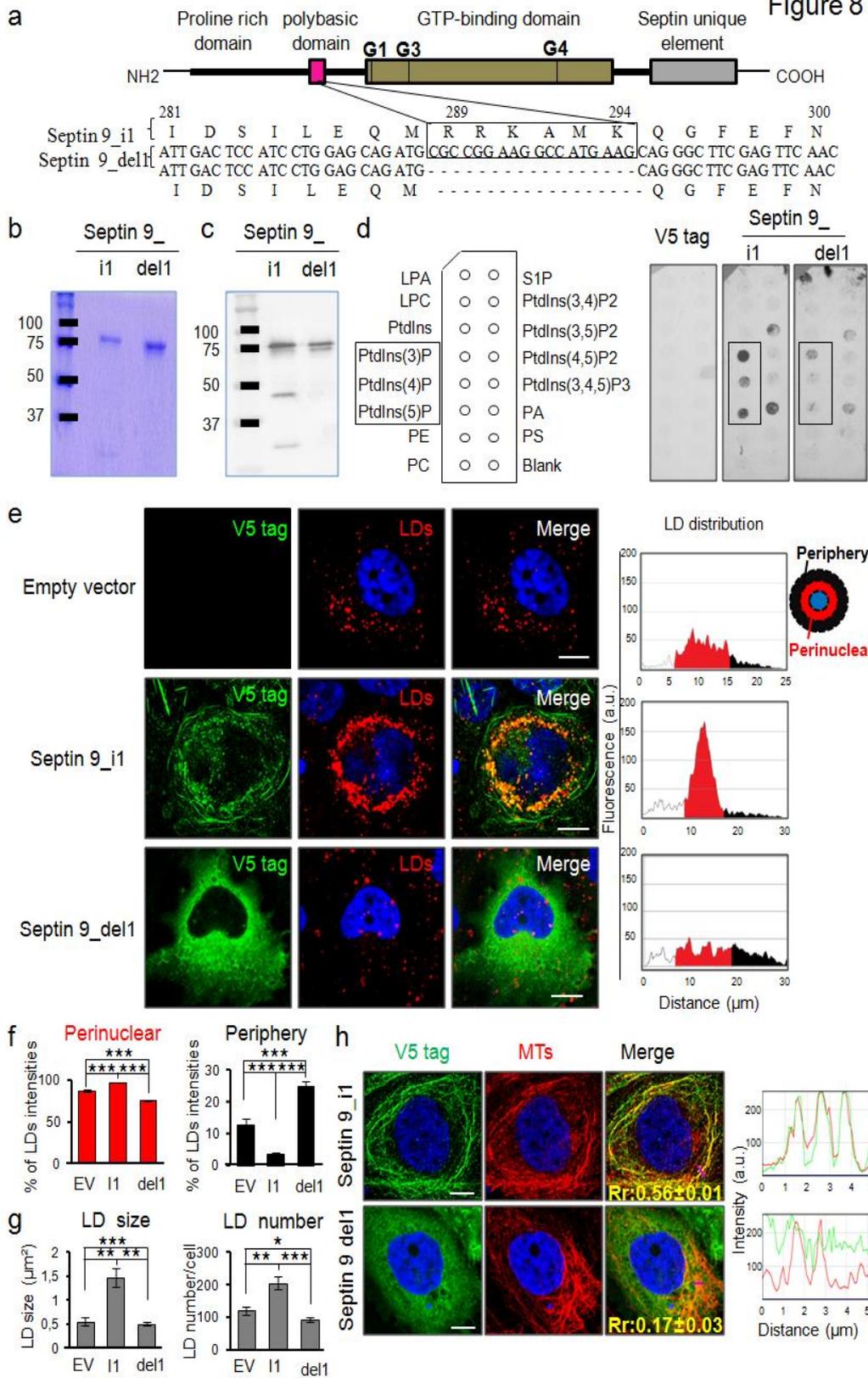


Figure 8



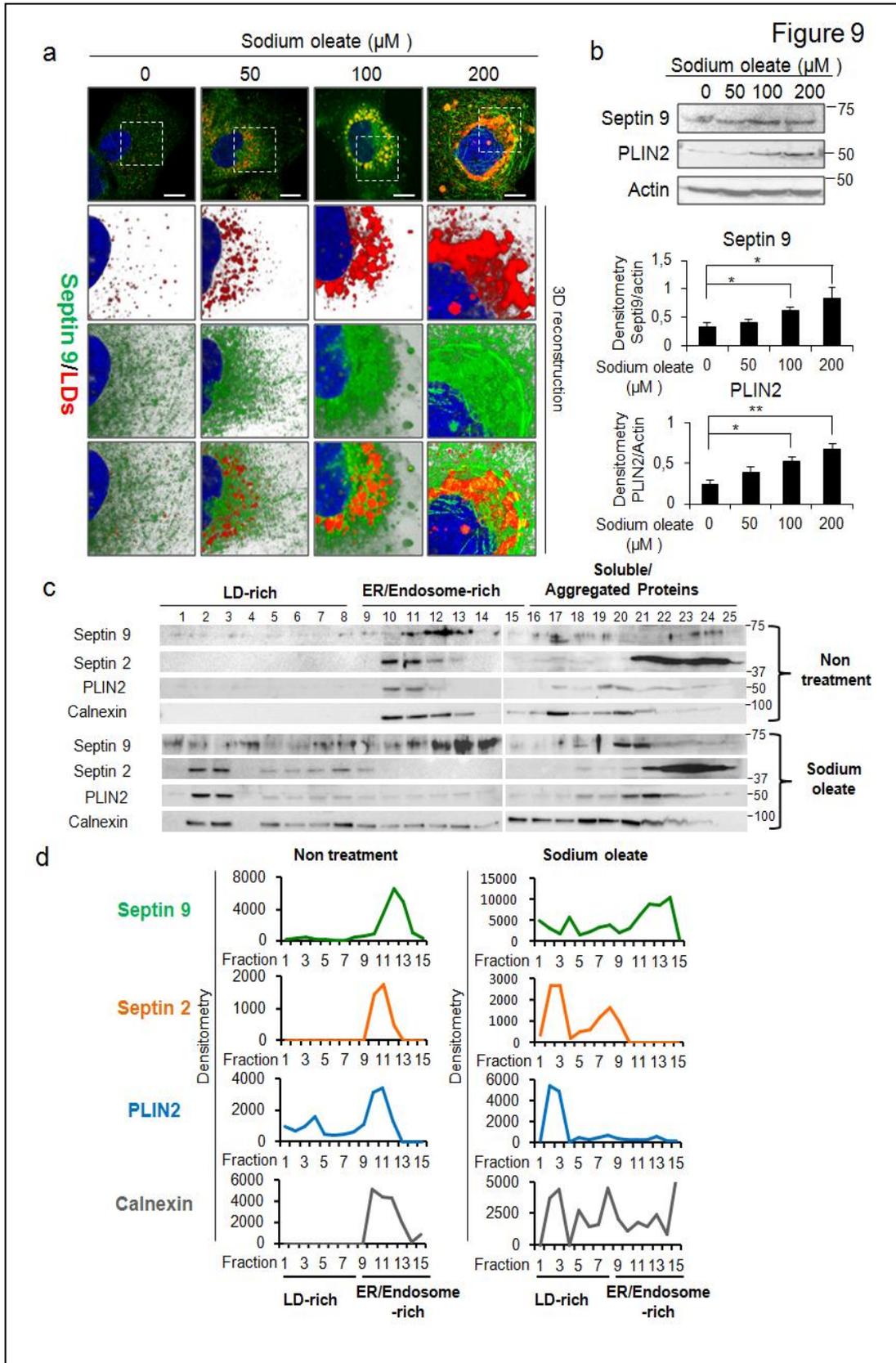


Figure 10

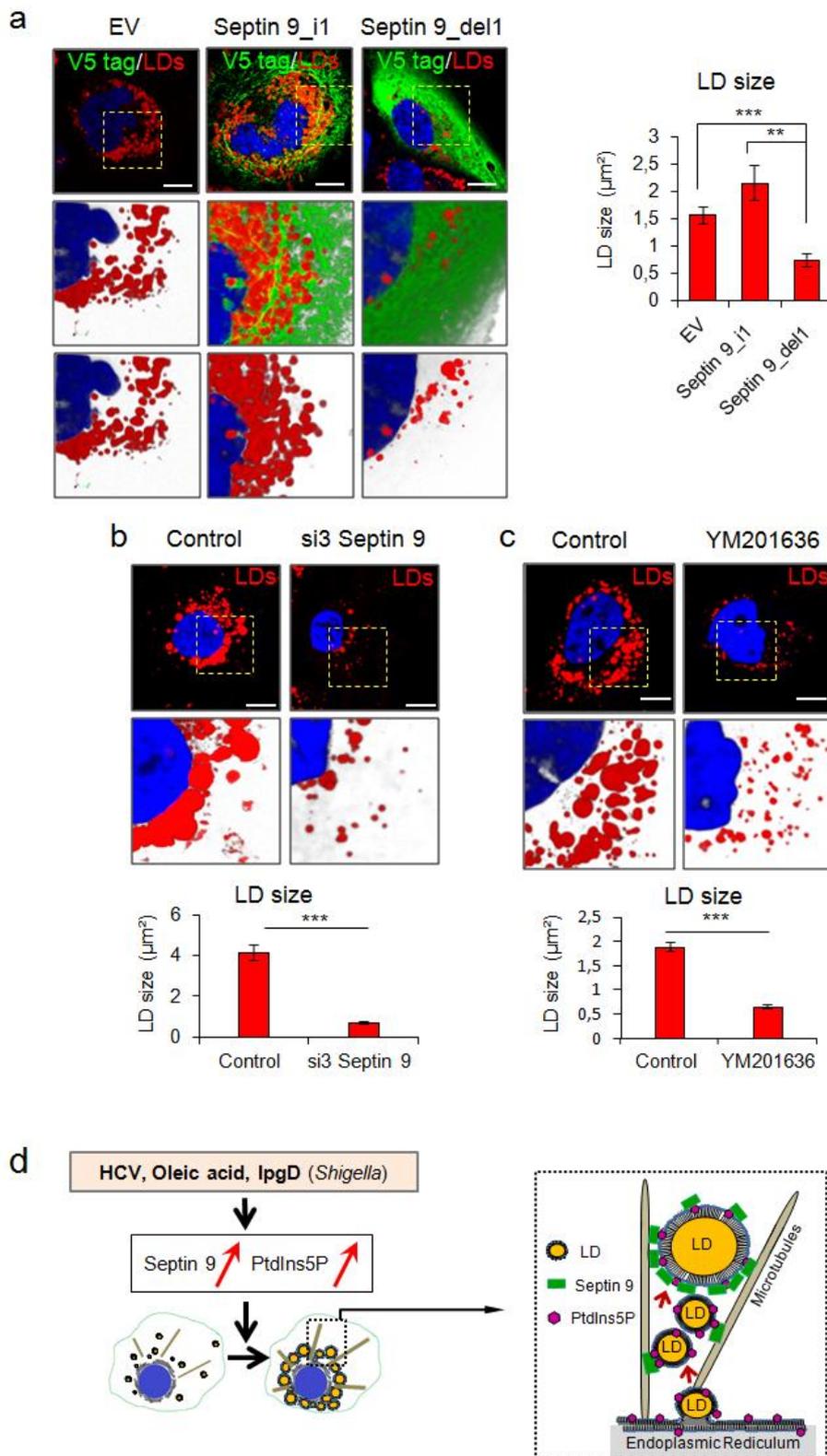


Figure S1

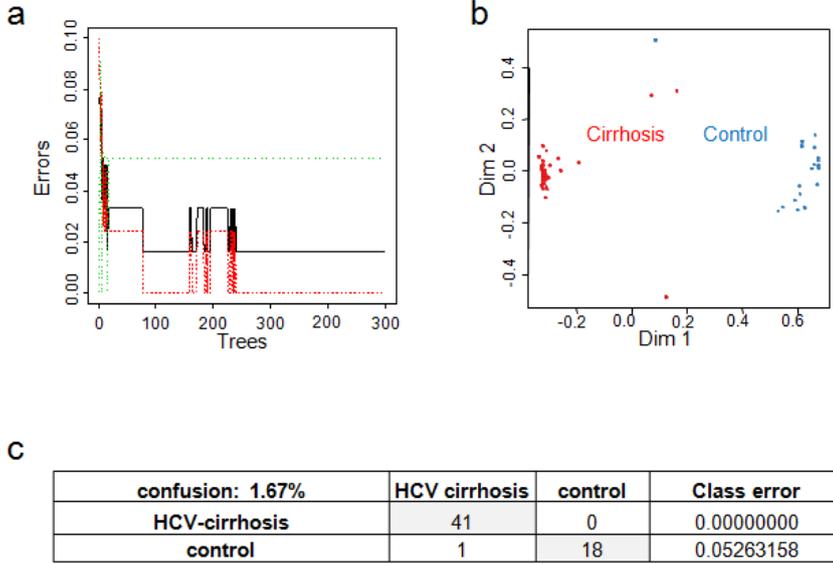


Figure S2

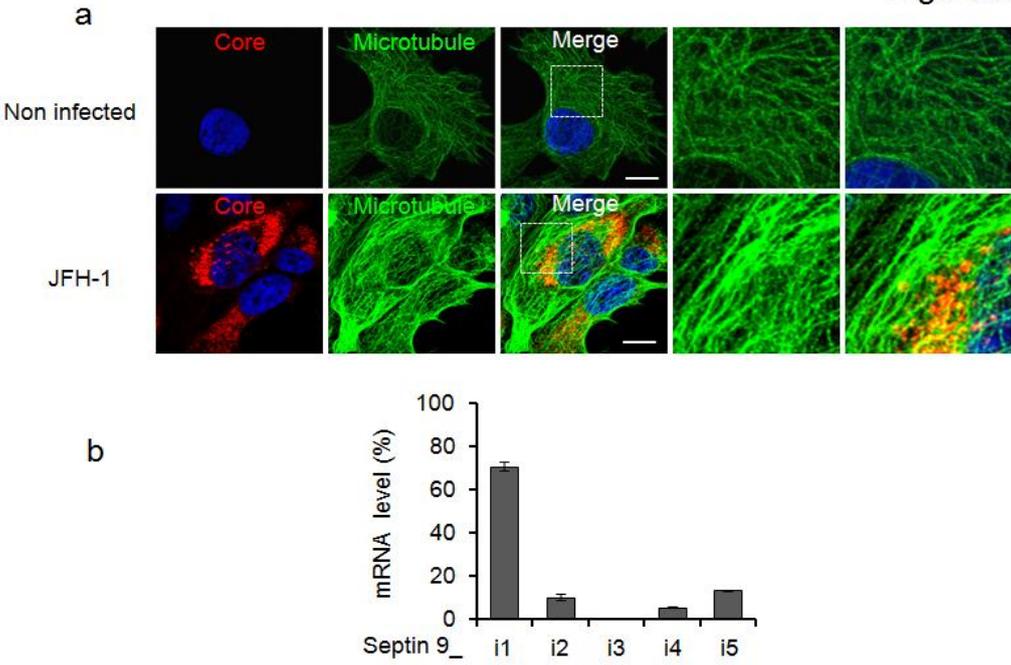


Figure S3

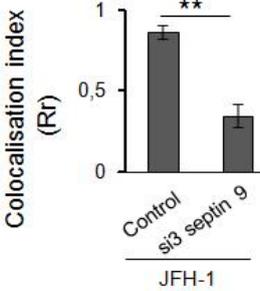
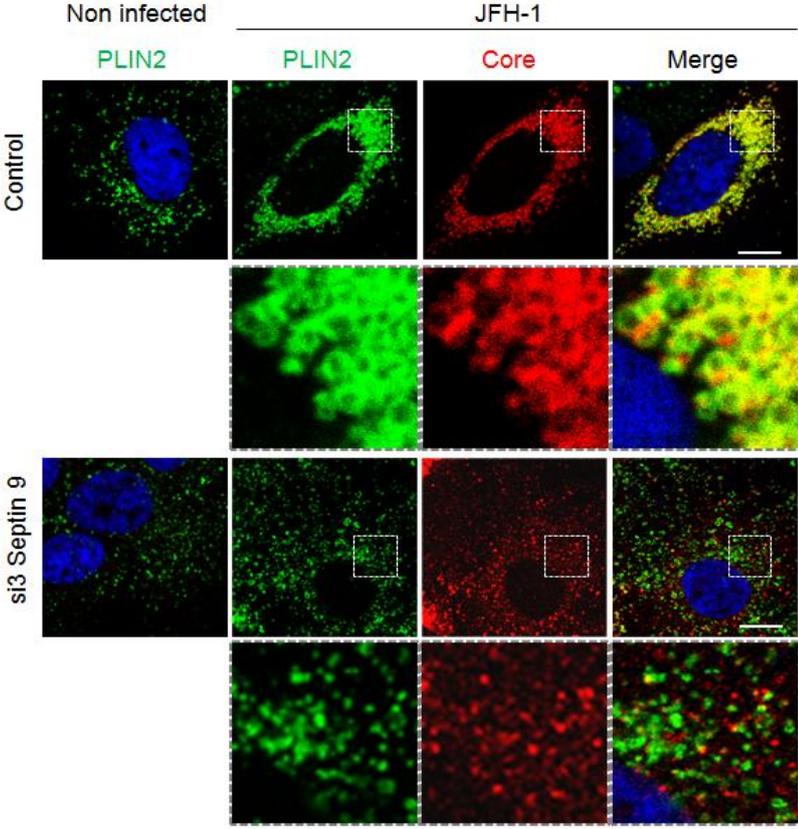


Figure S4

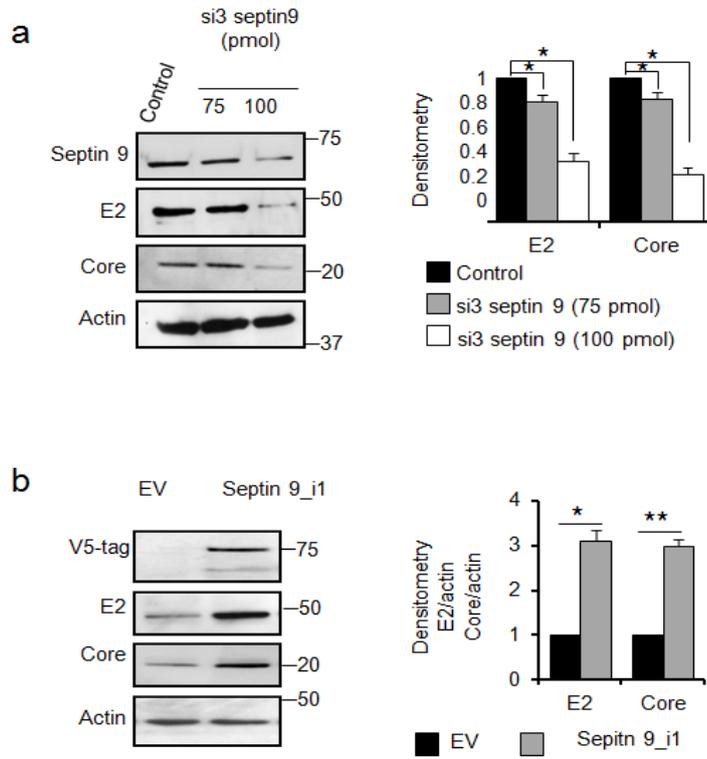


Figure S5

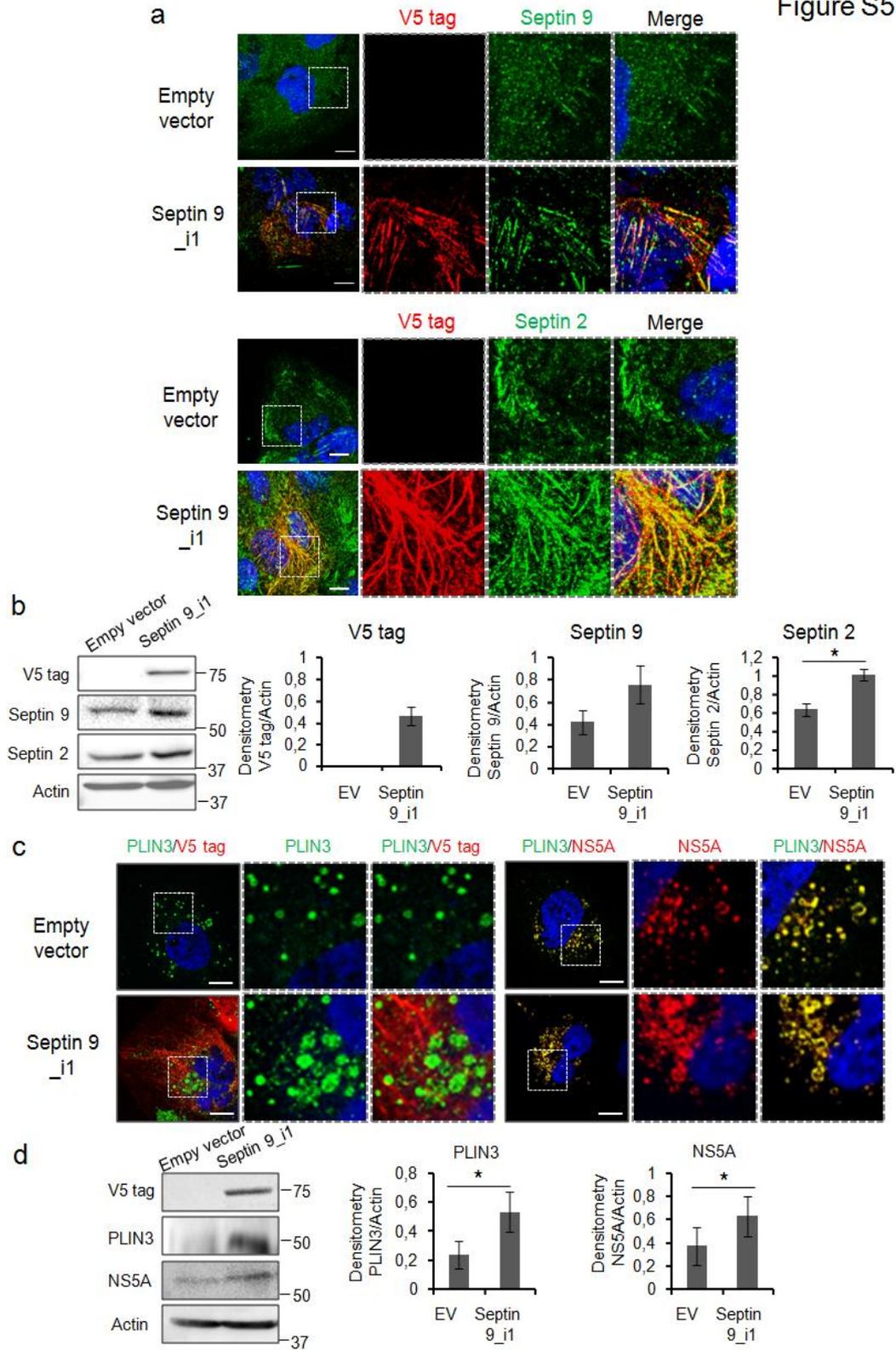


Figure S6

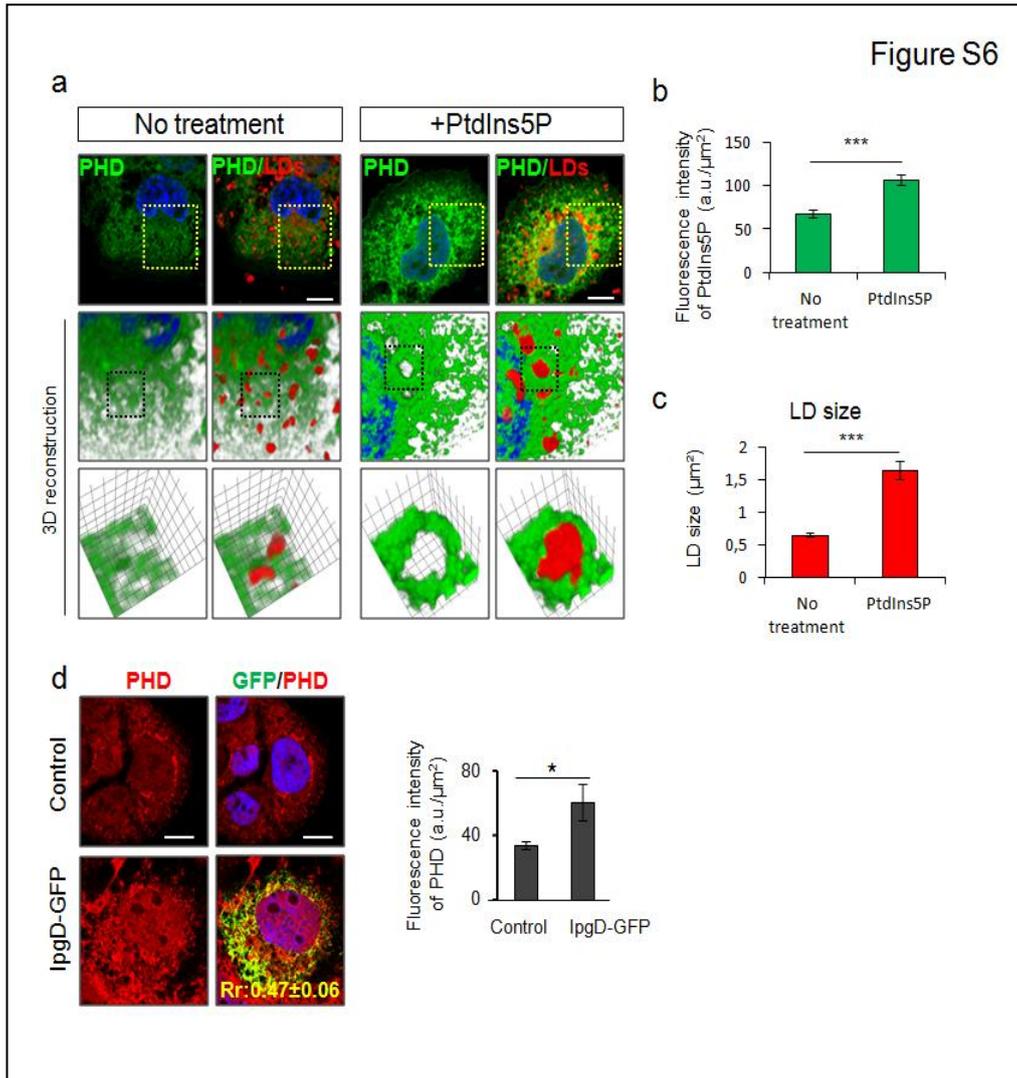


Figure S7

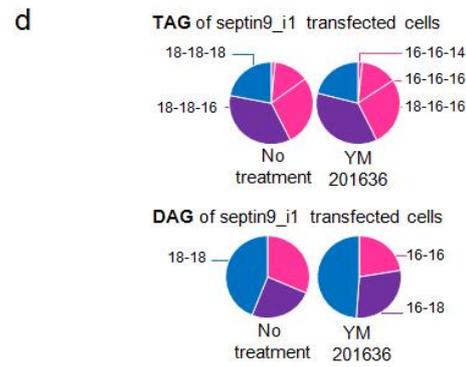
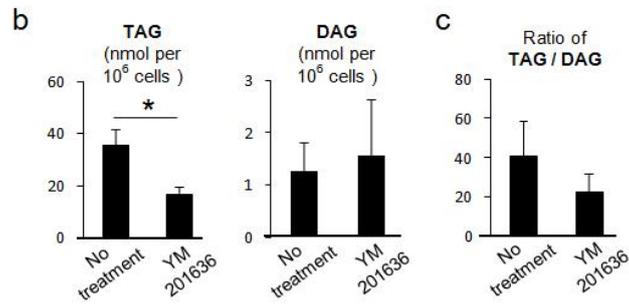
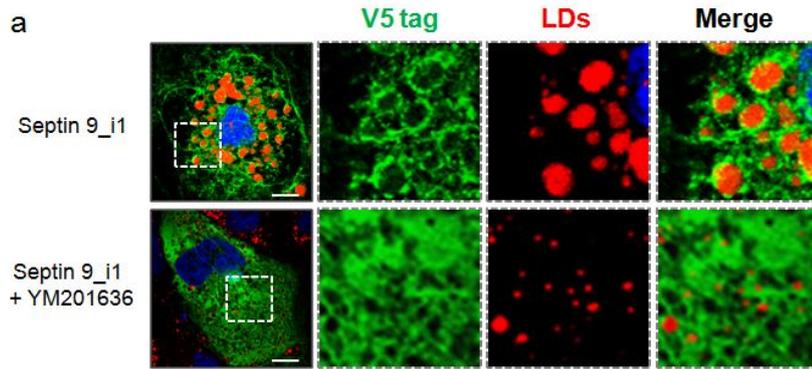


Figure S8

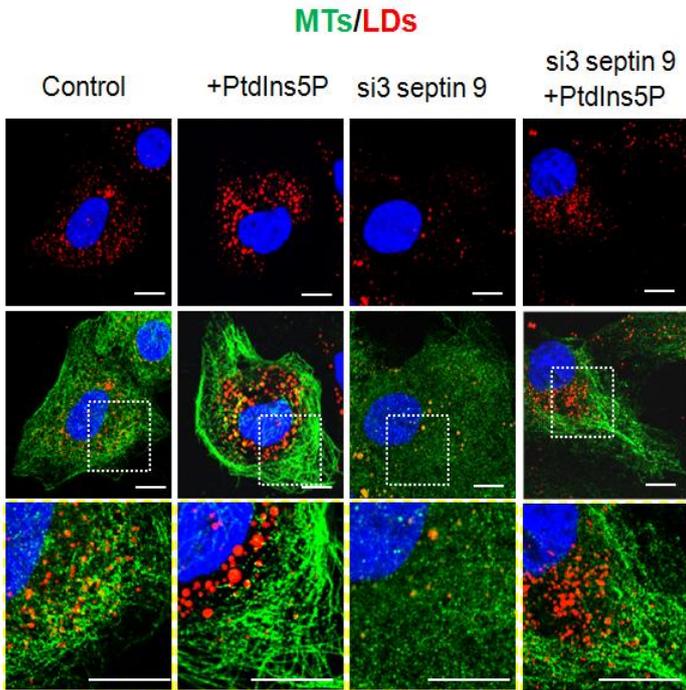


Figure S9

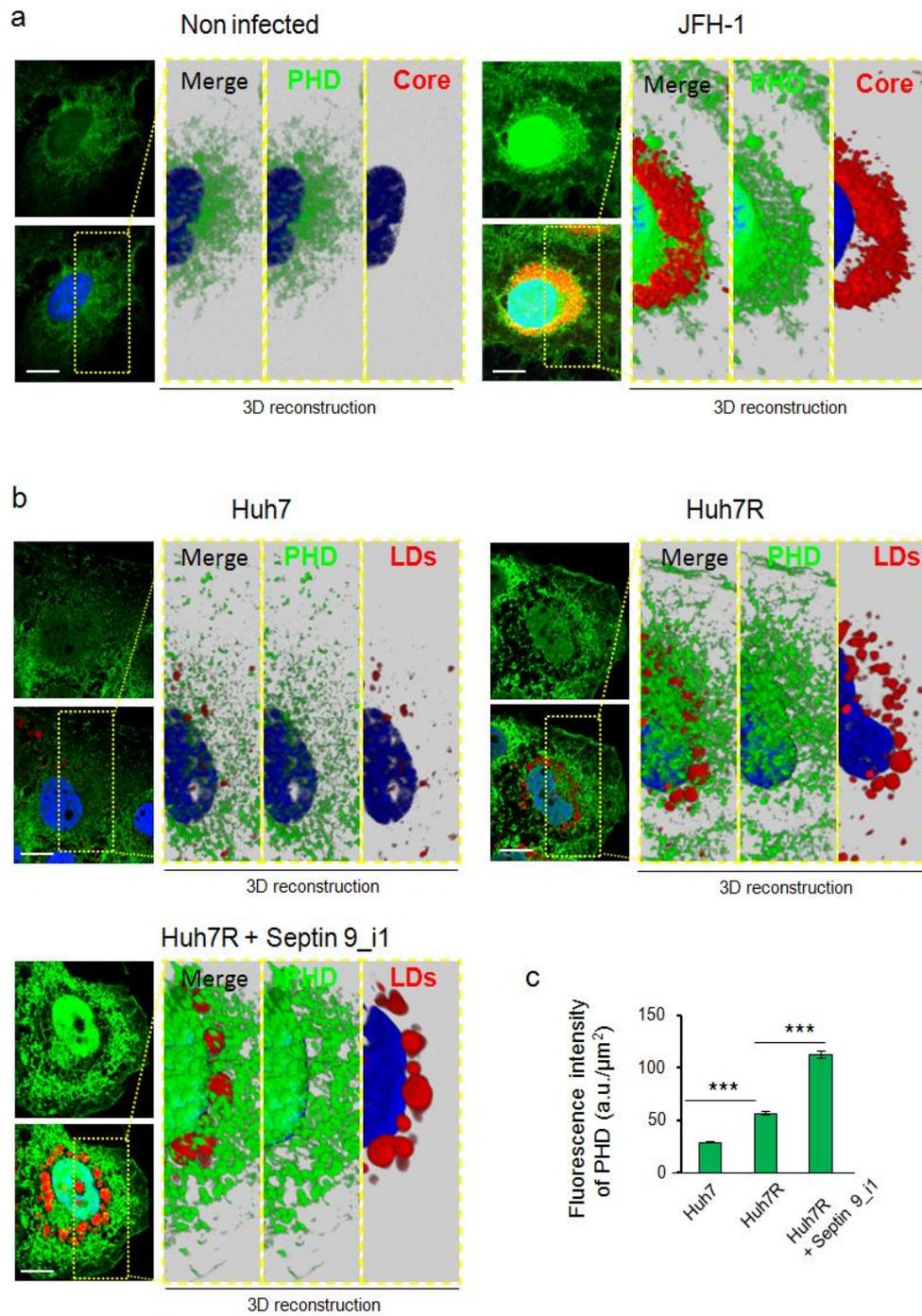


Figure S10

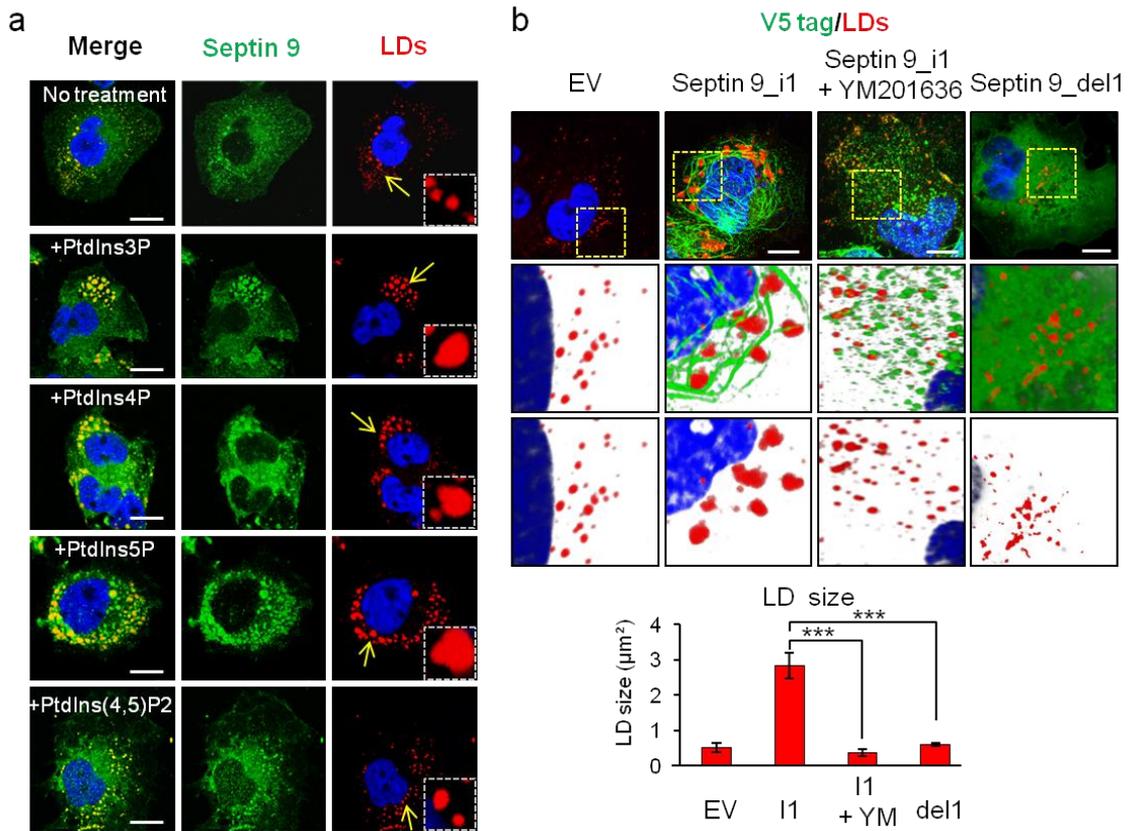
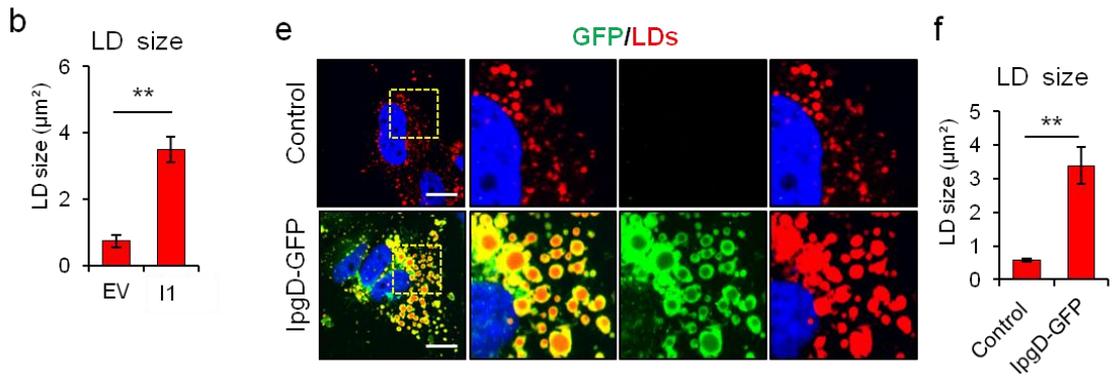
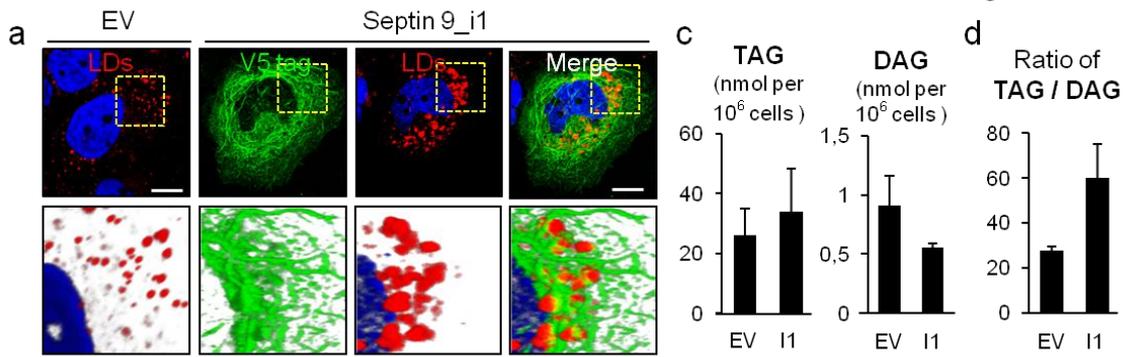


Figure S11

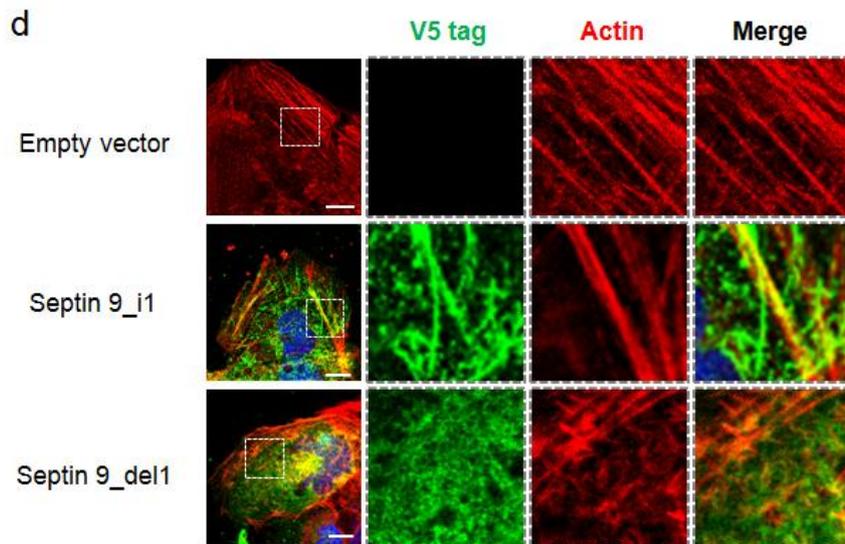
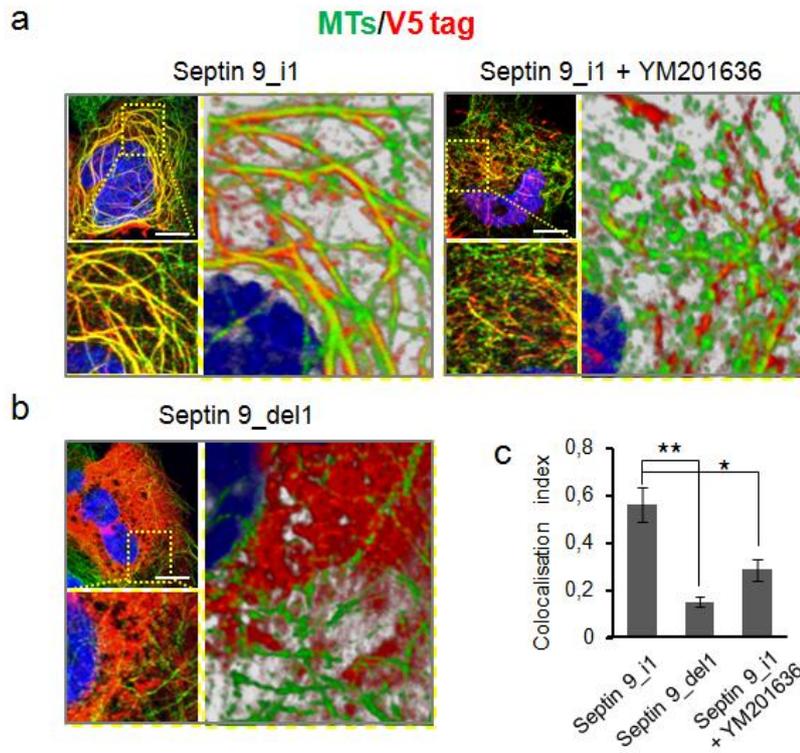
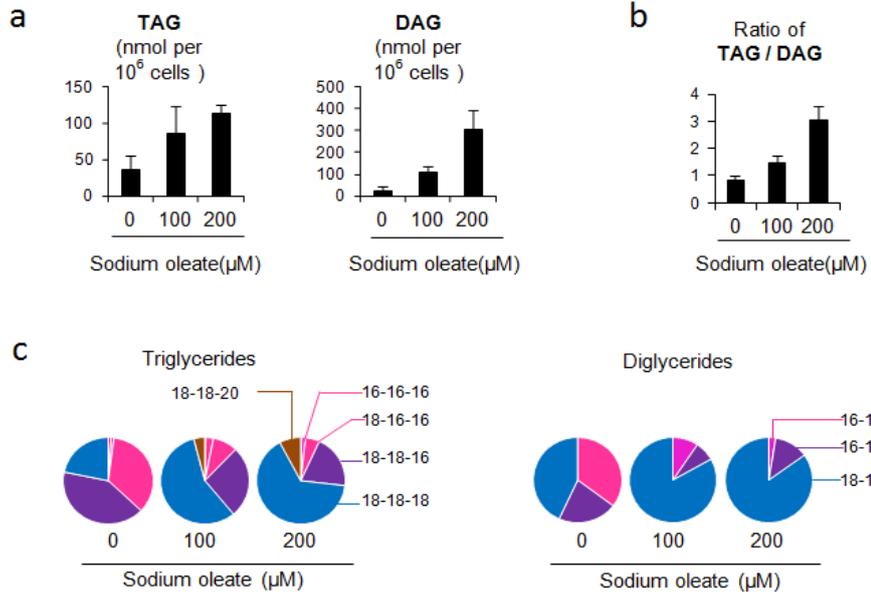


Figure S12





## 10. Discussion et perspectives :

Depuis leur identification les septines ont attiré l'attention des biologistes par leur capacité à assembler en structures comme des filaments et des anneaux et par leur rôle dans la modulation des membrane (Fung et al., 2014).

Les septines s'assemblent en hexamère (7-6-2-2-6-7) ou en octamères où la septine 9 occupe les deux extrémités de complexe (9-7-6-2-2-6-7-9). Les septines sont des protéines GTPases et interagissent entre elles soit par l'interface contenant le GTP/GDP (interface G) ou l'interface contenant les extrémité N et C de la protéine (interface NC) (Kim et al., 2011). Les hexamères et octamères représentent des blocs pour construire des structures d'ordre supérieur. Deux octamères associent bout à bout, par l'interaction des deux septines 9 par leur interface NC (Sandrock et al., 2011).

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l'interaction de la septine 9 avec les PIs. Nous avons trouvé que la délétion du domaine PB1, <sup>289</sup>RRKAMK<sup>294</sup> précédemment décrit d'être responsable de l'interaction des septines avec les PIs, diminue l'affinité de la protéine pour lier les PIs. Nous avons donc utilisé la modélisation moléculaire pour identifier d'autres sites potentiels d'interaction de la septine 9 avec les PIs. Nous avons identifié un deuxième domaine polybasique (PB2, <sup>399</sup>RKKR<sup>402</sup>). PB1 et PB2 sont localisés sur l'interface NC de la septine 9. En réalité, la délétion d'un ou tous les deux domaines polybasiques a abouti à la perte des filaments de la septine 9. Ceci pourrait être expliqué par l'implication des acides aminés basiques de PB1 et PB2 dans l'interaction septine-septine. Par ailleurs, il a été montré que l'assemblage des septines recombinantes est très lent mais ces protéines sont capables à s'assembler en structure d'ordre supérieur plus rapidement sur des membranes contenant des PIs (Tanaka-Takiguchi et al., 2009). Ce qui suggère un rôle des PIs dans l'assemblage des septines. Pour cela, il est difficile de déterminer si la perte des filaments des septines est un résultat de l'absence des acides aminés impliqués dans l'interaction septine-septine ou de la perte de la capacité des protéines mutantes à s'accrocher sur une membrane contenant les PIs ce qui est nécessaire pour leur assemblage. Pour cela, une étude plus fine est nécessaire pour réaliser des mutations ponctuelles sur les acides aminés impliqués dans l'interaction septines/PIs (R<sup>289</sup>, R<sup>290</sup>, K<sup>291</sup> and K<sup>400</sup>) pour arriver à des mutants incapables à se lier les PIs mais encore capables de s'assembler en structure d'ordre supérieurs.

*In vivo*, les septines sont couramment accumulées sous les invaginations ou les concavités des membranes telles que des sillons de clivage qui apparaissent au cours de la cytokinèse (Spiliotis and Nelson, 2006). La topologie de ces membranes est stabilisée par la présence des structures des septines comme il a été proposé par Tanaka-Takiguchi (Tanaka-Takiguchi et al., 2009). Il est possible que les septines soient associées aux membranes de Golgi pour stabiliser leur topologie à fin de maintenir la structure spécifique de cet organelle. La mutation de l'un ou des deux domaines polybasiques pourrait empêcher l'adressage de ces protéines aux membranes de Golgi et affecter également leur capacité à s'assembler et donc amener à la perte de leurs fonction et à la fragmentation de Golgi.

Les centrosomes sont le principal centre de l'organisation des microtubules. Leur orientation dans les cellules stimulées dépend de la capacité de l'appareil de Golgi à les réorganiser ce qui suggère un rôle essentiel de l'appareil Golgi dans le processus du positionnement des centrosomes (Bisel et al., 2008). De fait, nous avons trouvé que la déplétion en septine 9 aboutissait à la fragmentation du Golgi. Egalement, nous avons montré une distribution symétrique des filaments de la tubuline acétylée. Nous spéculons que la distribution symétrique des éléments de l'appareil Golgi fragmenté a affecté la distribution des microtubules et en conséquence la localisation de leur centre d'organisation les centrosomes.

Ces défauts dans la morphologie de l'appareil Golgi, le trafic intracellulaire et le positionnement des centrosomes pourraient affecter l'axe de la division ce qui entraîne la formation des cystes multiluminaux dans le cas des cellules MDCK exprimant des protéines septin 9<sub>del1</sub> et septine 9<sub>del1.2</sub> en culture 3D sur du matrigel.

Dans la deuxième partie de mes travaux de thèse, Nous avons montré un rôle inattendu de la septine 9 dans la régulation de l'homéostasie cellulaire des lipides.

En effet, Nous avons mis en évidence que la septine 9 est nécessaire pour l'accumulation des GLs dans les cellules infectées par le VHC et qu'elle régule la réplication du VHC. Septine 9 favorise le recrutement périnucléaire des protéines associées à la surface des GLs telles que TIP47, ainsi que le recrutement des protéines virales core et NS5A qui jouent un rôle essentiel dans le processus de réplication du VHC (Vogt et al., 2013). De plus, les résultats obtenus montrent que la septine 9 et la septine 2 sont recrutées sur les GLs lors de l'induction de synthèse lipidique. On peut spéculer que les septines pourraient former certaines structures servant comme échafaudages moléculaires nécessaires pour le recrutement des enzymes de la synthèse lipidique comme le DGAT1. Cette enzyme

est capable de former des complexes avec les protéines virales NS5A et core. Donc, lors de l'infection par le VHC les septines sont surexprimées et assemblées autour des GLs pour former un échafaudage qui recrute DGAT1 en complexe avec NS5A et la protéine core (Camus et al., 2013) (Vogt et al., 2013). Par ce fait, les septines pourraient être importantes pour le rapprochement des protéines virales aux GLs où se trouvent les sites de la réplication et de l'assemblage par la médiation de la protéine DGAT1.

Par ailleurs, la composition de la monocouche des phospholipides entourant les GLs régule leur taille (Thiam et al., 2013). Le substrat des PIs, le phosphatidylinositol (PtdIns) est un composant de la monocouche des phospholipides (Bartz et al., 2007b) ce qui rend la production des PIs sur la surface des GLs très possible. En fait, nous avons démontré que la septine 9 se lie les PtdIns mono-phosphorylé et que ces PIs favorisent la croissance de taille des GLs. Pour cela, nous proposons que la production des PIs sur la surface des GLs soit un régulateur de recrutement des septines sur les GLs pour la régulation de leur taille. En plus nous proposons que la septine 9 puisse agir comme un échafaudage pour établir la liaison entre les MTs et les GLs via la liaison avec le PtdIns5P qui recouvre la surface des GLs pour augmenter leur taille.

Ces résultats indiquent fortement un nouveau rôle du PtdIns5P comme un régulateur du recrutement de la septine 9 dans la régulation de la dynamique des microtubules et GLs, offrant ainsi une nouvelle vision sur le rôle biologique du PtdIns5P.

Des résultats supplémentaires ont été obtenus et pourraient constituer une base pour la suite de cette étude :

Le contenant lipidique global stocké dans les GLs des cellules hépatiques est contrôlé par les deux voies majeures du métabolisme :

1- La voie de l'anabolisme qui implique la synthèse des lipides et aboutit à l'augmentation du contenu lipidique des GLs par l'incorporation de triacylglycerides (TAG) et d'ester de cholestérol (CE).

2- La voie du catabolisme qui aboutit à la diminution du contenu lipidique des GLs par la voie de l'oxydation  $\beta$ , la dégradation par la lipophagie et l'exportation des lipides à travers l'assemblage et la sécrétion de VLDL.

Mes travaux de thèse ont montré un rôle inattendu de la septine 9 dans la régulation des GLs dans les hépatocytes. Nous avons montré que la surexpression de la septine 9 augmente le contenant cellulaire de TAG et sa déplétion fait le contraire.

En fait, ces résultats pourraient être expliqués par la favorisation des voies anaboliques ou par l'inhibition des voies cataboliques.

### **La favorisation des voies anaboliques :**

Dans la première partie du travail nous avons montré que l'augmentation des TAG pourrait-être le résultat du recrutement de DGAT1 autour les GLs dans les cellules surexprimant la septine 9.

D'une part, des études récentes ont décrit le PtdIns(5)P comme une molécule de signalisation impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires (Grainger et al., 2012), (Shisheva, 2013), (Devereaux and Di Paolo, 2013). D'autre part, les ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Protein Kinases 1 and 2*), qui font partie des cascades de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Avruch, 2007), sont impliquées dans la formation des GLs (Andersson et al., 2006). Pour cela, nous avons évalué l'effet de PtdIns5P sur la phosphorylation ERK1/2 et les résultats dans la figure 36 démontrent que le traitement des cellules avec le PtdIns5P exogène augmente significativement la phosphorylation d'ERK2.

Ensuite, les cellules Huh7 R ont été traitées ou non par le PD98059, un inhibiteur sélectif de MAP kinases qui empêche la phosphorylation d'ERK avant l'addition PtdIns5P exogène. Comme attendu dans les cellules non traitées, l'addition de PtdIns5P augmente fortement à la fois le signal de PHD et le taille des GLs tandis que le traitement préalable des cellules par le PD98059 empêche l'augmentation de taille des GLs induite normalement par l'addition de PtdIns5P. Ces données suggèrent que la phosphorylation d'ERK est nécessaire pour l'accumulation des GLs induite par le PtdIns5P. Pour cela, nous spéculons que ERK2 phosphorylée est un facteur déterminant en aval de la signalisation de PtdIns5P.

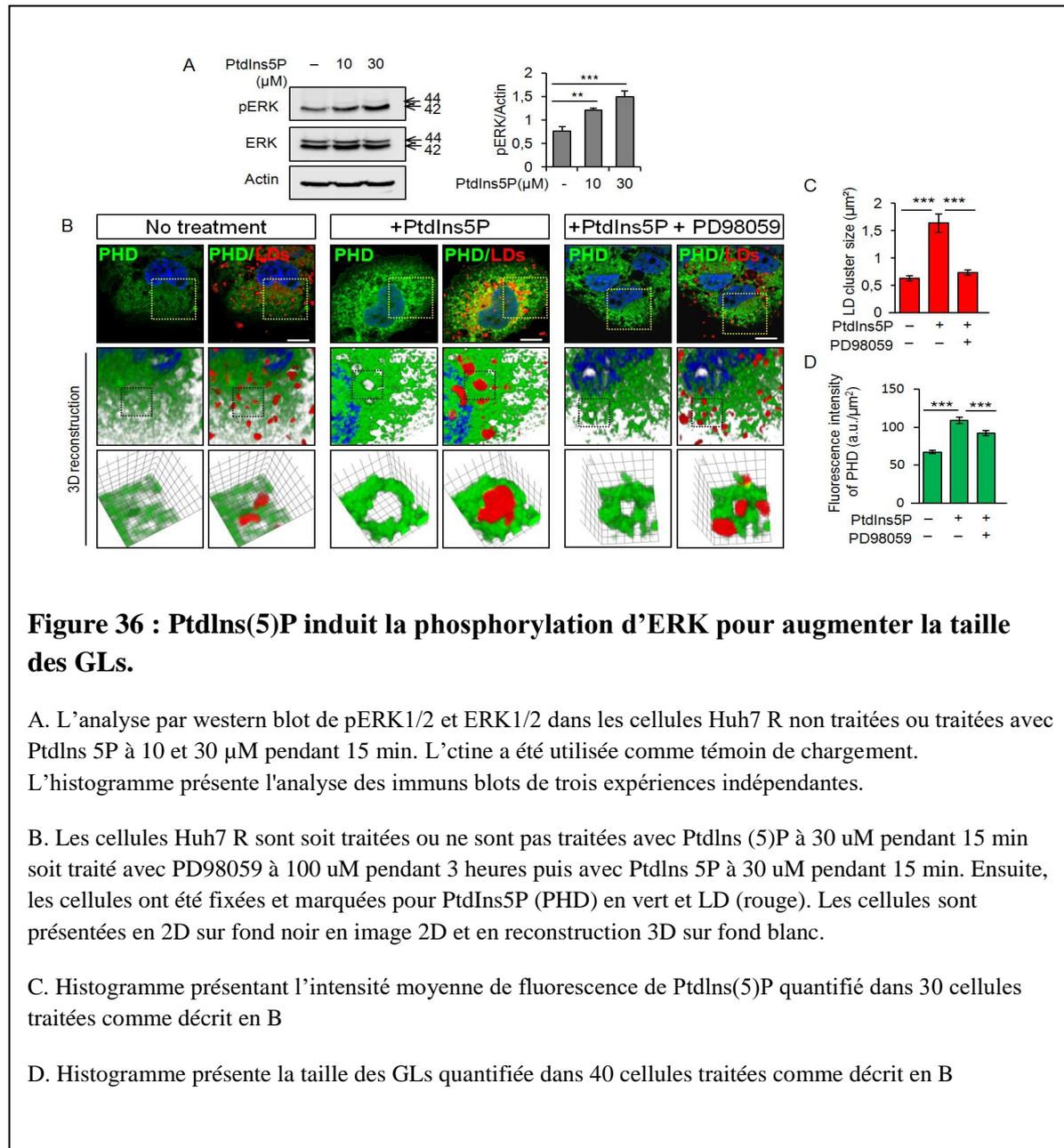
Par ailleurs, nous avons montré une augmentation de l'intensité de fluorescence de PtdIns5P dans les cellules huh7 R transfectées avec septine9\_i1 (Résultats, parti II figure S9). Nous spéculons donc que la surexpression de la septine 9 augmente le PtdIns5P qui induit la phosphorylation d'ERK qui aboutit à l'augmentation de taille des GLs.

Une des perspectives de ma thèse serait étudier les mécanismes impliqués dans la signalisation septine 9, PtdIns5P, ERK pour réguler les GLs. Pour ce faire, il faudrait répondre aux questions suivantes:

Comment PtdIns5P pourrait induire la phosphorylation d'ERK ?

Quel rôle, la septine 9, pourrait-elle jouer dans ce processus ?

Quels sont les facteurs en aval de pERK dans la cascade de régulation des GLs ?



**Figure 36 : PtdIns(5)P induit la phosphorylation d’ERK pour augmenter la taille des GLs.**

A. L’analyse par western blot de pERK1/2 et ERK1/2 dans les cellules Huh7 R non traitées ou traitées avec PtdIns 5P à 10 et 30 μM pendant 15 min. L’actine a été utilisée comme témoin de chargement.

L’histogramme présente l’analyse des immuns blots de trois expériences indépendantes.

B. Les cellules Huh7 R sont soit traitées ou ne sont pas traitées avec PtdIns (5)P à 30 uM pendant 15 min soit traité avec PD98059 à 100 uM pendant 3 heures puis avec PtdIns 5P à 30 uM pendant 15 min. Ensuite, les cellules ont été fixées et marquées pour PtdIns5P (PHD) en vert et LD (rouge). Les cellules sont présentées en 2D sur fond noir en image 2D et en reconstruction 3D sur fond blanc.

C. Histogramme présentant l’intensité moyenne de fluorescence de PtdIns(5)P quantifié dans 30 cellules traitées comme décrit en B

D. Histogramme présente la taille des GLs quantifiée dans 40 cellules traitées comme décrit en B

### L’inhibition des voies cataboliques :

L’hydrolyse des TAG en DAG et MAG représente la première étape dans le processus de lipolyse des GLs. Ce processus est catalysé par des lipases comme l’ATGL(*adipose triglyceride lipase*) et l’HSL(*hormonal sensitive lipase*). Les membres de la famille PLIN, régulent l’hydrolyse des TAG dépendant l’ATGL et l’HSL (Okumura, 2011), (Wang et al., 2011).

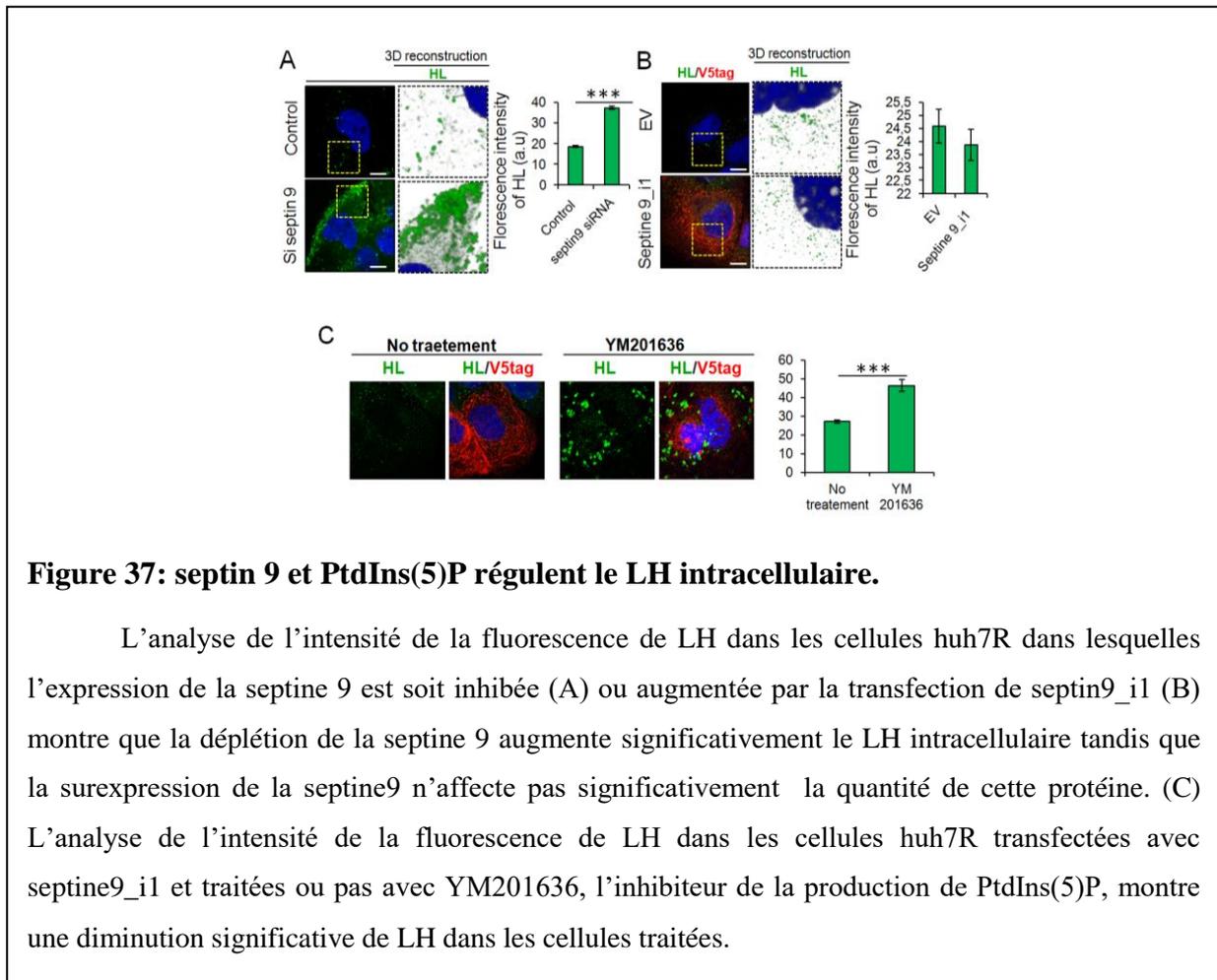
Les lipases, enzymes solubles dans l'eau, hydrolysent les liaisons ester des substrats hydrophobes tels que les TAG et les phospholipides. La famille des gènes des lipases incluent LPL (lipoprotéine lipase), LH (lipase hépatique) et la lipase pancréatique.

LH est une glycoprotéine catalysant l'hydrolyse des phospholipides et des triglycérides dans les lipoprotéines, ce qui contribue à la régulation des VLDL (lipoprotéines à très basse densité) ainsi que les IDL, LDL et HDL (lipoprotéines à moyenne, faible et haute densité, respectivement) (Yang and Subbaiah, 2015). LH est synthétisée et sécrétée principalement par les hépatocytes (Martin et al., 1988). Une fois sécrétée, LH se lie, par l'intermédiaire des *heparan sulfate proteoglycans* (HSPG) aux surfaces extérieures des microvillosités des hépatocytes dans l'espace de Disse et dans les espaces intérieurs des hépatocytes (Sanan et al., 1997).

Alors que la plupart des études ont décrit des rôles extracellulaires de LH dans le catabolisme des lipoprotéines plasmatiques, certaines données ont suggéré que LH peut également jouer un rôle intracellulaire. L'activité lipolytique de LH a été détectée dans le voie de sécrétion ER / Golgi dans les cellules ovariennes de l'hamster chinois et les hépatocytes primaires de rat (Verhoeven et al., 2000), (Ben-Zeev and Doolittle, 2004). Cependant, LH est localisée à l'ER dans les cellules McA-RH7777 et sa surexpression diminue le stockage de TAG et la sécrétion de VLDL (Erickson et al., 2013). Le processus d'assemblage des VLDL est initié lors de la traduction et la translocation de l'apoB-100 à travers la membrane d'ER (Sundaram and Yao, 2010). Les particules VLDL naissantes augmentent leur contenu en TAG à travers le processus de lipidation, où des nouveaux TAGs sont incorporés dans la VLDL naissante pour former la VLDL mature. La source principale de ces lipides se trouve dans les GLs cytoplasmiques (Filipe and McLauchlan, 2015). L'expression de LH humaine dans les cellules McA-RH7777, aboutit à la sécrétion des VLDLs pauvres en TAG (Bamji-Mirza et al., 2011).

Au cours de notre étude (Résultats, partie II) nous avons montré que la déplétion de la septine 9 (Résultats, Partie II figure 2, 3,4) ou l'inhibition de la production de PtdIns(5) P par YM201636 (Résultats, Partie II figure 7) induit la diminution de taille des GLs et que cette diminution est associée à une diminution de TAG dans ces cellules (Résultats, partie II, Figure 4, S7, S10) ce qui suggère une induction de lipolyse. Pour cela nous avons étudié des lipases éventuellement impliqués dans la lipolyse comme la lipase hépatique. Effectivement, nous avons trouvé une accumulation de LH lors de la déplétion de la septine 9 ou le

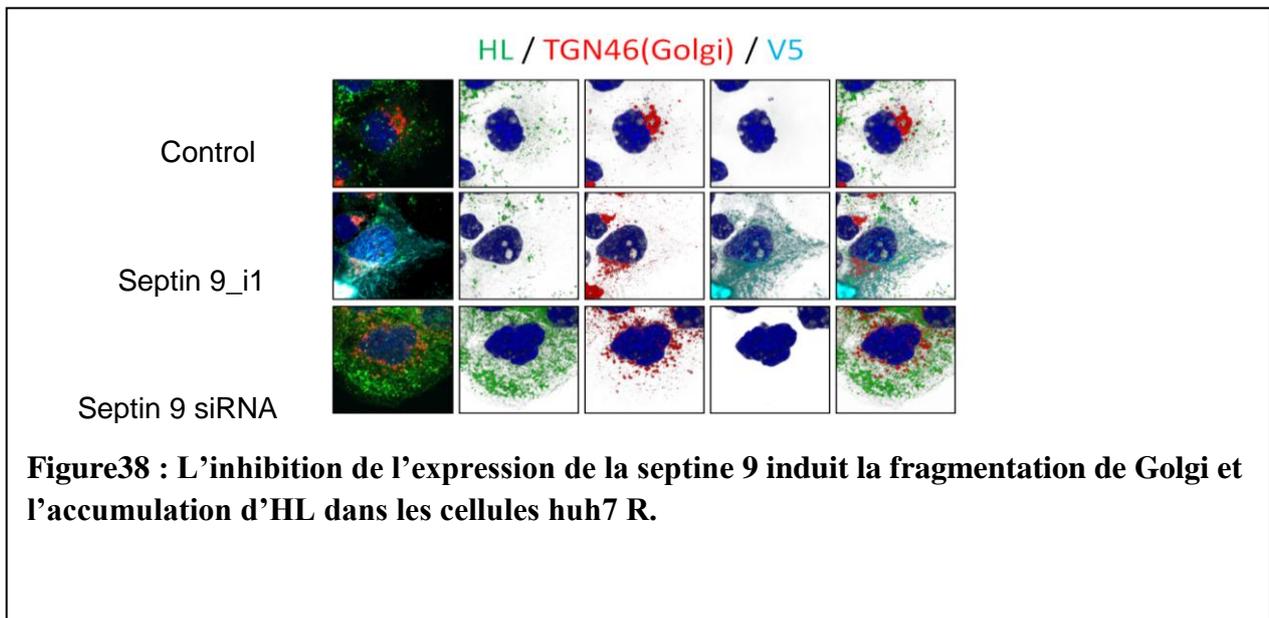
traitement par YM201636 (Figure 37) ce qui pourrait expliquer la diminution de taille des GLs dans ces cellules (Résultats, Parti II figure 2, 3, 4,7).



**Figure 37: septin 9 et PtdIns(5)P régulent le LH intracellulaire.**

L'analyse de l'intensité de la fluorescence de LH dans les cellules huh7R dans lesquelles l'expression de la septine 9 est soit inhibée (A) ou augmentée par la transfection de septin9\_i1 (B) montre que la déplétion de la septine 9 augmente significativement le LH intracellulaire tandis que la surexpression de la septine9 n'affecte pas significativement la quantité de cette protéine. (C) L'analyse de l'intensité de la fluorescence de LH dans les cellules huh7R transfectées avec septin9\_i1 et traitées ou pas avec YM201636, l'inhibiteur de la production de PtdIns(5)P, montre une diminution significative de LH dans les cellules traitées.

Par ailleurs, LH est une glycoprotéine synthétisée à l'ER et activée pendant son passage à travers l'appareil Golgi (Verhoeven et al., 2000). Nous avons co-marqué LH et le TGN dans les cellules huh7R dans lesquelles la septine 9 est surexprimée ou inhibée et nous avons trouvé que l'inhibition de l'expression de la septine 9 aboutit à fragmentation de l'appareil Golgi et induit également l'accumulation de LH dans ces cellules (Figure 38)



En vu de ces résultats préliminaires nous proposons l'hypothèse suivante :

La septine9 pourrait être impliquée dans la voie de VLDL et serait nécessaire pour la régulation de LH. En fait, la déplétion de la septine 9 pourrait induire la fragmentation de l'appareil Golgi et affecter la sécrétion des protéines comme LH qui est une glycoprotéine destinée à la sécrétion ce qui aboutit à l'accumulation de cette lipase dans les cellules. Il a été rapporté que LH diminue le stockage de TAG (Bamji-Mirza et al., 2011), (Erickson et al., 2013). Nous suggérons que l'activité de lipolyse effectuée par la LH accumulée dans les cellules est responsable de la diminution de la taille et le nombre des GLs lors de la déplétion de la septine 9.

L'étude de l'implication de la septine 9 dans la régulation de LH et la voie de VLDL constitue une autre perspective de ma thèse.

## 11. Conclusion finale

D'un part, Nos résultats ont mis en évidence la présence d'un deuxième domaine polybasique impliqué dans l'interaction de la septine 9 avec les PIs. Egalement, nous avons montré la nécessité des deux domaines polybasiques de la septine 9 pour la régulation de la morphologie de Golgi et l'établissement de la polarité apico-basale.

D'un autre part, nous avons décrit un rôle inattendu de la septine 9 et le PtdIns5P dans la régulation de l'hémostasie des lipides dans les cellules hépatiques. Egalement, nos résultats ont mis en lumière l'augmentation des septines par l'infection par le VHC et la dérégulation de ces protéines chez les patients atteints de cirrhose induite par ce virus. Par ailleurs, nous avons montré dans les cellules huh7 que l'apport abondant des acides gras aboutit à l'augmentation d'expression des septines et leur recrutement sur les GLs est un processus nécessaire pour l'accumulation des GLs. Pour cela, il tentant de spéculer que le VHC a besoin des septines pour déréguler le métabolisme des lipides, induire l'accumulation des GLs et recruter les protéines virales sur les sites de réplication afin de réaliser son cycle de réplication. Cette étude pourrait être un pas vers la découverte des nouvelles voies de signalisation responsables de la régulation des GLs. Ces nouvelles voies pourraient constituer une cible pour de nouvelles stratégies de traitement des maladies métaboliques et spécialement celles induites par le VHC.



## 12. Références

- Agircan, F.G., Schiebel, E., and Mardin, B.R. (2014). Separate to operate: control of centrosome positioning and separation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369.
- Ali, M.F., Chachadi, V.B., Petrosyan, A., and Cheng, P.-W. (2012). Golgi phosphoprotein 3 determines cell binding properties under dynamic flow by controlling Golgi localization of core 2 N-acetylglucosaminyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* 287, 39564–39577.
- Allan, B.B., Moyer, B.D., and Balch, W.E. (2000). Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289, 444–448.
- Altan-Bonnet, N., Sougrat, R., and Lippincott-Schwartz, J. (2004). Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 364–372.
- Alvarez, C., Fujita, H., Hubbard, A., and Sztul, E. (1999). ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J. Cell Biol.* 147, 1205–1222.
- Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Hauri, H.-P., and Sztul, E. (2001). The p115-interactive Proteins GM130 and Giantin Participate in Endoplasmic Reticulum-Golgi Traffic. *J. Biol. Chem.* 276, 2693–2700.
- Amin, N.D., Zheng, Y.-L., Kesavapany, S., Kanungo, J., Guszczynski, T., Sihag, R.K., Rudrabhatla, P., Albers, W., Grant, P., and Pant, H.C. (2008). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of human septin SEPT5 (hCDCrel-1) modulates exocytosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3631–3643.
- Amir, S., and Mabjeesh, N.J. (2007). SEPT9\_V1 protein expression is associated with human cancer cell resistance to microtubule-disrupting agents. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1926–1931.
- Amir, S., Wang, R., Matzkin, H., Simons, J.W., and Mabjeesh, N.J. (2006). MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis. *Cancer Res.* 66, 856–866.
- Amir, S., Wang, R., Simons, J.W., and Mabjeesh, N.J. (2009). SEPT9\_v1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* 284, 11142–11151.
- Amir, S., Golan, M., and Mabjeesh, N.J. (2010). Targeted knockdown of SEPT9\_v1 inhibits tumor growth and angiogenesis of human prostate cancer cells concomitant with disruption of hypoxia-inducible factor-1 pathway. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 643–652.
- Andersson, L., Boström, P., Ericson, J., Rutberg, M., Magnusson, B., Marchesan, D., Ruiz, M., Asp, L., Huang, P., Frohman, M.A., et al. (2006). PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *J. Cell Sci.* 119, 2246–2257.
- André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchet, C., Paranhos-Baccalà, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J. Virol.* 76, 6919–6928.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4, e1000035.
- Ariotti, N., Murphy, S., Hamilton, N.A., Wu, L., Green, K., Schieber, N.L., Li, P., Martin, S., and Parton, R.G. (2012). Postlipolytic insulin-dependent remodeling of micro lipid droplets in adipocytes. *Mol. Biol. Cell* 23, 1826–1837.
- Austin, C., Boehm, M., and Tooze, S.A. (2002). Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 4669–4677.
- Avruch, J. (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1150–1160.
- Bai, X., Bowen, J.R., Knox, T.K., Zhou, K., Pendziwiat, M., Kuhlenbäumer, G., Sindelar, C.V., and Spiliotis, E.T. (2013). Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J. Cell Biol.* 203, 895–905.
- Bamji-Mirza, M., Sundaram, M., Zhong, S., Yao, E.F., Parks, R.J., and Yao, Z. (2011). Secretion of

- triacylglycerol-poor VLDL particles from McA-RH7777 cells expressing human hepatic lipase. *J. Lipid Res.* 52, 540–548.
- Banerjee, A., Meyer, K., Mazumdar, B., Ray, R.B., and Ray, R. (2010). Hepatitis C virus differentially modulates activation of forkhead transcription factors and insulin-induced metabolic gene expression. *J. Virol.* 84, 5936–5946.
- Bannykh, S.I., Nishimura, N., and Balch, W.E. (1998). Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol.* 8, 21–25.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T., et al. (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1200–1205.
- Barlowe, C. (2000). Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic Cph. Den.* 1, 371–377.
- Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., and Snyder, M. (1999). Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev.* 13, 176–187.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S., and Snyder, M. (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol. Cell* 5, 841–851.
- Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 81, 1631–1648.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* 19, 95–103.
- Bartz, R., Li, W.-H., Venables, B., Zehmer, J.K., Roth, M.R., Welti, R., Anderson, R.G.W., Liu, P., and Chapman, K.D. (2007a). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* 48, 837–847.
- Bartz, R., Zehmer, J.K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y., and Liu, P. (2007b). Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res.* 6, 3256–3265.
- Beites, C.L., Xie, H., Bowser, R., and Trimble, W.S. (1999). The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat. Neurosci.* 2, 434–439.
- Beites, C.L., Campbell, K.A., and Trimble, W.S. (2005). The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem. J.* 385, 347–353.
- Benga, W.J.A., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., et al. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51, 43–53.
- Bennett, K.L., Karpenko, M., Lin, M.-T., Claus, R., Arab, K., Dyckhoff, G., Plinkert, P., Herpel, E., Smiraglia, D., and Plass, C. (2008). Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 68, 4494–4499.
- Ben-Zeev, O., and Doolittle, M.H. (2004). Maturation of hepatic lipase. Formation of functional enzyme in the endoplasmic reticulum is the rate-limiting step in its secretion. *J. Biol. Chem.* 279, 6171–6181.
- Bernsmeier, C., Calabrese, D., Heim, M.H., and Duong, H.T.F. (2014). Hepatitis C virus dysregulates glucose homeostasis by a dual mechanism involving induction of PGC1 $\alpha$  and dephosphorylation of FoxO1. *J. Viral Hepat.* 21, 9–18.
- Bertin, A., McMurray, M.A., Grob, P., Park, S.-S., Garcia, G., Patanwala, I., Ng, H.-L., Alber, T., Thorner, J., and Nogales, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 8274–8279.
- Bertin, A., McMurray, M.A., Thai, L., Garcia, G., Votin, V., Grob, P., Allyn, T., Thorner, J., and Nogales, E. (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J. Mol. Biol.* 404, 711–731.
- Bertin, A., McMurray, M.A., Pierson, J., Thai, L., McDonald, K.L., Zehr, E.A., Garcia, G., Peters, P., Thorner, J., and Nogales, E. (2012). Three-dimensional ultrastructure of the septin filament network in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 23, 423–432.

- Bisel, B., Wang, Y., Wei, J.-H., Xiang, Y., Tang, D., Miron-Mendoza, M., Yoshimura, S., Nakamura, N., and Seemann, J. (2008). ERK regulates Golgi and centrosome orientation towards the leading edge through GRASP65. *J. Cell Biol.* *182*, 837–843.
- Blagoveshchenskaya, A., Cheong, F.Y., Rohde, H.M., Glover, G., Knödler, A., Nicolson, T., Boehmelt, G., and Mayinger, P. (2008). Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *J. Cell Biol.* *180*, 803–812.
- Borkhardt, A., Teigler-Schlegel, A., Fuchs, U., Keller, C., König, M., Harbott, J., and Haas, O.A. (2001). An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2. *Genes. Chromosomes Cancer* *32*, 82–88.
- Bose, S.K., Kim, H., Meyer, K., Wolins, N., Davidson, N.O., and Ray, R. (2014). Forkhead box transcription factor regulation and lipid accumulation by hepatitis C virus. *J. Virol.* *88*, 4195–4203.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R., and Cosset, F.-L. (2011). A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog.* *7*, e1002144.
- Boström, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M.A., Borén, J., and Olofsson, S.-O. (2005). Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 1945–1951.
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Borén, J., et al. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1286–1293.
- Boucrot, E., Ferreira, A.P.A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., and McMahon, H.T. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* *517*, 460–465.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., and Lavergne, J.-P. (2005). Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J. Virol.* *79*, 11353–11365.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* *281*, 22236–22247.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117–127.
- Brasaemle, D.L., and Wolins, N.E. (2012). Packaging of Fat: An Evolving Model of Lipid Droplet Assembly and Expansion. *J. Biol. Chem.* *287*, 2273–2279.
- Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruija-Gray, J., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* *275*, 38486–38493.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F.A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 13034–13039.
- Bridges, A.A., and Gladfelter, A.S. (2015). Septin Form and Function at the Cell Cortex. *J. Biol. Chem.* *290*, 17173–17180.
- Burrows, J.F., Chanduloy, S., McIlhatton, M.A., Nagar, H., Yeates, K., Donaghy, P., Price, J., Godwin, A.K., Johnston, P.G., and Russell, S.E.H. (2003). Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *J. Pathol.* *201*, 581–588.
- Byers, B., and Goetsch, L. (1976). A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J. Cell Biol.* *69*, 717–721.
- Cabrera, R., and Nelson, D.R. (2010). Review article: the management of hepatocellular carcinoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *31*, 461–476.
- Camus, G., Herker, E., Modi, A.A., Haas, J.T., Ramage, H.R., Farese, R.V., and Ott, M. (2013). Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J. Biol. Chem.* *288*, 9915–9923.
- Cardenas, J., Rivero, S., Goud, B., Bornens, M., and Rios, R.M. (2009). Golgi localisation of GMAP210 requires two distinct cis-membrane binding mechanisms. *BMC Biol.* *7*, 56.

- Casamayor, A., and Snyder, M. (2003). Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2762–2777.
- Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., and Rice, C.M. (2013). Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9505–9510.
- Cerveira, N., Correia, C., Bizarro, S., Pinto, C., Lisboa, S., Mariz, J.M., Marques, M., and Teixeira, M.R. (2006). SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene* *25*, 6147–6152.
- Chacko, A.D., Hyland, P.L., McDade, S.S., Hamilton, P.W., Russell, S.H., and Hall, P.A. (2005). SEPT9\_v4 expression induces morphological change, increased motility and disturbed polarity. *J. Pathol.* *206*, 458–465.
- Chacko, A.D., McDade, S.S., Chanduloy, S., Church, S.W., Kennedy, R., Price, J., Hall, P.A., and Russell, S.E.H. (2012). Expression of the SEPT9\_i4 isoform confers resistance to microtubule-interacting drugs. *Cell. Oncol. Dordr.* *35*, 85–93.
- de Chassey, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M.S., Aublin-Gex, A., Agaugué, S., Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B.F., Chantier, T., et al. (2008). Hepatitis C virus infection protein network. *Mol. Syst. Biol.* *4*, 230.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 98–106.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* *244*, 359–362.
- Choo, Q.L., Weiner, A.J., Overby, L.R., Kuo, G., Houghton, M., and Bradley, D.W. (1990). Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* *46*, 423–441.
- Clément, S., Peyrou, M., Sanchez-Pareja, A., Bourgoin, L., Ramadori, P., Suter, D., Vinciguerra, M., Guilloux, K., Pascarella, S., Rubbia-Brandt, L., et al. (2011). Down-regulation of phosphatase and tensin homolog by hepatitis C virus core 3a in hepatocytes triggers the formation of large lipid droplets. *Hepatol. Baltim. Md* *54*, 38–49.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000). Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J. Virol.* *74*, 3623–3633.
- Colanzi, A., Hidalgo Carcedo, C., Persico, A., Cericola, C., Turacchio, G., Bonazzi, M., Luini, A., and Corda, D. (2007). The Golgi mitotic checkpoint is controlled by BARS-dependent fission of the Golgi ribbon into separate stacks in G2. *EMBO J.* *26*, 2465–2476.
- Coller, K.E., Heaton, N.S., Berger, K.L., Cooper, J.D., Saunders, J.L., and Randall, G. (2012). Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* *8*, e1002466.
- Collie, A.M.B., Landsverk, M.L., Ruzzo, E., Mefford, H.C., Buysse, K., Adkins, J.R., Knutzen, D.M., Barnett, K., Brown, R.H., Parry, G.J., et al. (2010). Non-recurrent SEPT9 duplications cause hereditary neuralgic amyotrophy. *J. Med. Genet.* *47*, 601–607.
- Connolly, D., Yang, Z., Castaldi, M., Simmons, N., Oktay, M.H., Coniglio, S., Fazzari, M.J., Verdier-Pinard, P., and Montagna, C. (2011). Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res. BCR* *13*, R76.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D’Andrea, A., Nuti, S., D’Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., et al. (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J. Exp. Med.* *195*, 35–41.
- D’Angelo, G., Vicinanza, M., Di Campli, A., and De Matteis, M.A. (2008). The multiple roles of PtdIns(4)P -- not just the precursor of PtdIns(4,5)P2. *J. Cell Sci.* *121*, 1955–1963.
- De Matteis, M.A., and Godi, A. (2004). Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta* *1666*, 264–274.
- De Matteis, M.A., and Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 273–284.
- Del Nery, E., Miserey-Lenkei, S., Falguières, T., Nizak, C., Johannes, L., Perez, F., and Goud, B. (2006). Rab6A and Rab6A’ GTPases play non-

- overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic Cph. Den.* *7*, 394–407.
- DeMay, B.S., Bai, X., Howard, L., Occhipinti, P., Meseroll, R.A., Spiliotis, E.T., Oldenbourg, R., and Gladfelter, A.S. (2011). Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals. *J. Cell Biol.* *193*, 1065–1081.
- Demmel, L., Gravert, M., Ercan, E., Habermann, B., Müller-Reichert, T., Kukhtina, V., Haucke, V., Baust, T., Sohrmann, M., Kalaidzidis, Y., et al. (2008). The clathrin adaptor Gga2p is a phosphatidylinositol 4-phosphate effector at the Golgi exit. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1991–2002.
- Deng, Y., Golinelli-Cohen, M.-P., Smirnova, E., and Jackson, C.L. (2009). A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor. *EMBO Rep.* *10*, 58–64.
- Dent, J., Kato, K., Peng, X.-R., Martinez, C., Cattaneo, M., Poujol, C., Nurden, P., Nurden, A., Trimble, W.S., and Ware, J. (2002). A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3064–3069.
- Derby, M.C., and Gleeson, P.A. (2007). New insights into membrane trafficking and protein sorting. *Int. Rev. Cytol.* *261*, 47–116.
- Devereaux, K., and Di Paolo, G. (2013). PI5P migrates out of the PIP shadow. *EMBO Rep.* *14*, 214–215.
- Dharancy, S., Malapel, M., Perlemuter, G., Roskams, T., Cheng, Y., Dubuquoy, L., Podevin, P., Conti, F., Canva, V., Philippe, D., et al. (2005). Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* *128*, 334–342.
- Dippold, H.C., Ng, M.M., Farber-Katz, S.E., Lee, S.-K., Kerr, M.L., Peterman, M.C., Sim, R., Wiharto, P.A., Galbraith, K.A., Madhavarapu, S., et al. (2009). GOLPH3 Bridges Phosphatidylinositol-4- Phosphate and Actomyosin to Stretch and Shape the Golgi to Promote Budding. *Cell* *139*, 337–351.
- Dubuisson, J. (2007). Hepatitis C virus proteins. *World J. Gastroenterol.* *13*, 2406–2415.
- Duijsings, D., Lanke, K.H.W., van Dooren, S.H.J., van Dommelen, M.M.T., Wetzels, R., de Mattia, F., Wessels, E., and van Kuppeveld, F.J.M. (2009). Differential membrane association properties and regulation of class I and class II Arfs. *Traffic Cph. Den.* *10*, 316–323.
- Dunn, K.W., McGraw, T.E., and Maxfield, F.R. (1989). Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* *109*, 3303–3314.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., and Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* *279*, 580–585.
- Echard, A., el Marjou, A., and Goud, B. (2001). Expression, purification, and biochemical properties of rabkinesin-6 domains and their interactions with Rab6A. *Methods Enzymol.* *329*, 157–165.
- Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P.M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A.R.R., McLeod, I.X., et al. (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* *12*, 917–930.
- Egea, G., Lázaro-Diéguéz, F., and Vilella, M. (2006). Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 168–178.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* *76*, 5974–5984.
- Ellson, C., Davidson, K., Anderson, K., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2006). PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation. *EMBO J.* *25*, 4468–4478.
- Epp, N., Rethmeier, R., Krämer, L., and Ungermann, C. (2011). Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 779–785.
- Erickson, B., Selvan, S.P., Ko, K.W.S., Kelly, K., Quiroga, A.D., Li, L., Nelson, R., King-Jones, K., Jacobs, R.L., and Lehner, R. (2013). Endoplasmic reticulum-localized hepatic lipase decreases triacylglycerol storage and VLDL secretion. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 1113–1123.
- Estey, M.P., Di Ciano-Oliveira, C., Froese, C.D., Bejide, M.T., and Trimble, W.S. (2010). Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *J. Cell Biol.* *191*, 741–749.

- Falasca, M., Hughes, W.E., Dominguez, V., Sala, G., Fostira, F., Fang, M.Q., Cazzolli, R., Shepherd, P.R., James, D.E., and Maffucci, T. (2007). The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* *282*, 28226–28236.
- Fattovich, G., Giustina, G., Degos, F., Diodati, G., Tremolada, F., Nevens, F., Almasio, P., Solinas, A., Brouwer, J.T., Thomas, H., et al. (1997). Effectiveness of interferon alfa on incidence of hepatocellular carcinoma and decompensation in cirrhosis type C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *J. Hepatol.* *27*, 201–205.
- Feinstein, T.N., and Linstedt, A.D. (2007). Mitogen-activated protein kinase kinase 1-dependent Golgi unlinking occurs in G2 phase and promotes the G2/M cell cycle transition. *Mol. Biol. Cell* *18*, 594–604.
- Feinstein, T.N., and Linstedt, A.D. (2008). GRASP55 regulates Golgi ribbon formation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2696–2707.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., and Holland, P.V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* *292*, 767–770.
- Février, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 415–421.
- Field, C.M., al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M.L., Alberts, B., and Mitchison, T.J. (1996). A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J. Cell Biol.* *133*, 605–616.
- Filipe, A., and McLauchlan, J. (2015). Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends Mol. Med.* *21*, 34–42.
- Foti, M., Audhya, A., and Emr, S.D. (2001). Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2396–2411.
- Franke, W.W., Kartenbeck, J., Krien, S., VanderWoude, W.J., Scheer, U., and Morré, D.J. (1972). Inter- and intracisternal elements of the Golgi apparatus. A system of membrane-to-membrane cross-links. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* *132*, 365–380.
- Franke, W.W., Hergt, M., and Grund, C. (1987). Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* *49*, 131–141.
- Frazier, J.A., Wong, M.L., Longtine, M.S., Pringle, J.R., Mann, M., Mitchison, T.J., and Field, C. (1998). Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J. Cell Biol.* *143*, 737–749.
- Froidevaux-Klipfel, L., Poirier, F., Boursier, C., Crépin, R., Poüs, C., Baudin, B., and Baillet, A. (2011). Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Proteomics* *11*, 3877–3886.
- Froidevaux-Klipfel, L., Targa, B., Cantaloube, I., Ahmed-Zaïd, H., Poüs, C., and Baillet, A. (2015). Septin cooperation with tubulin polyglutamylation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget* *6*, 36063–36080.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* *437*, 1043–1047.
- Fung, K.Y.Y., Dai, L., and Trimble, W.S. (2014). Cell and molecular biology of septins. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *310*, 289–339.
- Gale, M.J., Korth, M.J., and Katze, M.G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin. Diagn. Virol.* *10*, 157–162.
- Garcia, G., Bertin, A., Li, Z., Song, Y., McMurray, M.A., Thorner, J., and Nogales, E. (2011). Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J. Cell Biol.* *195*, 993–1004.
- García, I.A., Martínez, H.E., and Alvarez, C. (2011). Rab1b regulates COPI and COPII dynamics in mammalian cells. *Cell. Logist.* *1*, 159–163.
- García-Fernández, M., Kissel, H., Brown, S., Gorenc, T., Schile, A.J., Rafii, S., Larisch, S., and Steller, H. (2010). Sept4/ARTS is required for stem cell apoptosis and tumor suppression. *Genes Dev.* *24*, 2282–2293.

- Gassama-Diagne, A., Yu, W., ter Beest, M., Martin-Belmonte, F., Kierbel, A., Engel, J., and Mostov, K. (2006). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 963–970.
- Gentzsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P.M., Frentzen, A., Kaderali, L., and Pietschmann, T. (2013). hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog.* 9, e1003355.
- Ghossoub, R., Hu, Q., Failler, M., Rouyez, M.-C., Spitzbarth, B., Mostowy, S., Wolfrum, U., Saunier, S., Cossart, P., Jamesnelson, W., et al. (2013). Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *J. Cell Sci.* 126, 2583–2594.
- Gilden, J.K., Peck, S., Chen, Y.-C.M., and Krummel, M.F. (2012). The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing. *J. Cell Biol.* 196, 103–114.
- Gimm, T., Wiese, M., Teschemacher, B., Deggerich, A., Schödel, J., Knaup, K.X., Hackenbeck, T., Hellerbrand, C., Amann, K., Wiesener, M.S., et al. (2010). Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 4443–4458.
- Gladfelter, A.S., Pringle, J.R., and Lew, D.J. (2001). The septin cortex at the yeast mother–bud neck. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 681–689.
- Gladfelter, A.S., Bose, I., Zyla, T.R., Bardes, E.S.G., and Lew, D.J. (2002). Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J. Cell Biol.* 156, 315–326.
- Glick, B.S., and Malhotra, V. (1998). The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* 95, 883–889.
- Glick, B.S., and Nakano, A. (2009). Membrane Traffic Within the Golgi Apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 113–132.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D., and De Matteis, M.A. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1, 280–287.
- Golan, M., and Mabeesh, N.J. (2013). SEPT9\_i1 is required for the association between HIF-1 $\alpha$  and importin- $\alpha$  to promote efficient nuclear translocation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 2297–2308.
- Gong, J., Sun, Z., and Li, P. (2009). CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 121–126.
- Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R.G., and Li, P. (2011). Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J. Cell Biol.* 195, 953–963.
- Gonzalez, M.E., Peterson, E.A., Privette, L.M., Loffreda-Wren, J.L., Kalikin, L.M., and Petty, E.M. (2007). High SEPT9\_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. *Cancer Res.* 67, 8554–8564.
- Gorzin, A.A., Ramsland, P.A., Tachedjian, G., and Gowans, E.J. (2012). Identification of residues involved in NS2 homodimerization and elucidation of their impact on the HCV life cycle. *J. Viral Hepat.* 19, 189–198.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* 77, 5487–5492.
- Gottfried, Y., Rotem, A., Lotan, R., Steller, H., and Larisch, S. (2004). The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. *EMBO J.* 23, 1627–1635.
- Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., and Saraste, J. (1990). Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345, 553–556.
- Gozani, O., Karuman, P., Jones, D.R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A.A., Baird, C.L., Zhu, H., Field, S.J., Lessnick, S.L., et al. (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99–111.
- Grainger, D.L., Tavelis, C., Ryan, A.J., and Hinchliffe, K.A. (2012). The emerging role of PtdIns5P: another signalling phosphoinositide takes its place. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 257–261.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., and Londos, C.

- (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* *266*, 11341–11346.
- Griffiths, G., and Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* *234*, 438–443.
- Gross, D.A., Zhan, C., and Silver, D.L. (2011). Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19581–19586.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 317–323.
- Guittard, G., Gérard, A., Dupuis-Coronas, S., Tronchère, H., Mortier, E., Favre, C., Olive, D., Zimmermann, P., Payrastra, B., and Nunès, J.A. (2009). Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells. *J. Immunol.* *Baltim. Md* *1950* *182*, 3974–3978.
- Hagiwara, A., Tanaka, Y., Hikawa, R., Morone, N., Kusumi, A., Kimura, H., and Kinoshita, M. (2011). Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskelet. Hoboken NJ* *68*, 512–525.
- Hammond, A.T., and Glick, B.S. (2000). Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* *11*, 3013–3030.
- Hanai, N., Nagata, K., Kawajiri, A., Shiromizu, T., Saitoh, N., Hasegawa, Y., Murakami, S., and Inagaki, M. (2004). Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Lett.* *568*, 83–88.
- Hannibal, M.C., Ruzzo, E.K., Miller, L.R., Betz, B., Buchan, J.G., Knutzen, D.M., Barnett, K., Landsverk, M.L., Brice, A., LeGuern, E., et al. (2009). SEPT9 gene sequencing analysis reveals recurrent mutations in hereditary neuralgic amyotrophy. *Neurology* *72*, 1755–1759.
- Hartwell, L.H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* *69*, 265–276.
- Helbig, K.J., Lau, D.T.-Y., Semendric, L., Harley, H.A.J., and Beard, M.R. (2005). Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology. Baltim. Md* *42*, 702–710.
- Helbig, K.J., Eyre, N.S., Yip, E., Narayana, S., Li, K., Fiches, G., McCartney, E.M., Jangra, R.K., Lemon, S.M., and Beard, M.R. (2011). The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology. Baltim. Md* *54*, 1506–1517.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., and Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.* *16*, 1295–1298.
- Hernández-Rodríguez, Y., and Momany, M. (2012). Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 660–668.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* *67*, 4665–4675.
- Hnia, K., Vaccari, I., Bolino, A., and Laporte, J. (2012). Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* *18*, 317–327.
- Hoffman, B., and Liu, Q. (2011). Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *31*, 1449–1467.
- Hsu, S.C., Hazuka, C.D., Roth, R., Foletti, D.L., Heuser, J., and Scheller, R.H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* *20*, 1111–1122.
- Hu, Q., Nelson, W.J., and Spiliotis, E.T. (2008). Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. *J. Biol. Chem.* *283*, 29563–29571.
- Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M.P., Nachury, M.V., Spiliotis, E.T., and Nelson, W.J. (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* *329*, 436–439.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R.S., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., and Cameron, C.E. (2005). Hepatitis C virus

- nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* *280*, 36417–36428.
- Huang, Y.-W., Surka, M.C., Reynaud, D., Pace-Asciak, C., and Trimble, W.S. (2006). GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *FEBS J.* *273*, 3248–3260.
- Ihara, M., Yamasaki, N., Hagiwara, A., Tanigaki, A., Kitano, A., Hikawa, R., Tomimoto, H., Noda, M., Takanashi, M., Mori, H., et al. (2007). Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alpha-synuclein neurotoxicity. *Neuron* *53*, 519–533.
- Ikonomov, O.C., Fligger, J., Sbrissa, D., Dondapati, R., Mlak, K., Deeb, R., and Shisheva, A. (2009). Kinesin adapter JLP links PIKfyve to microtubule-based endosome-to-trans-Golgi network traffic of furin. *J. Biol. Chem.* *284*, 3750–3761.
- Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., Nozawa, Y., Narumiya, S., Asano, T., and Nagata, K.-I. (2005). Possible role of Rho/Rhotekin signaling in mammalian septin organization. *Oncogene* *24*, 7064–7072.
- Ivetac, I., Munday, A.D., Kisseleva, M.V., Zhang, X.-M., Luff, S., Tiganis, T., Whisstock, J.C., Rowe, T., Majerus, P.W., and Mitchell, C.A. (2005). The type I alpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2218–2233.
- Iwase, M., Luo, J., Nagaraj, S., Longtine, M., Kim, H.B., Haarer, B.K., Caruso, C., Tong, Z., Pringle, J.R., and Bi, E. (2006). Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1110–1125.
- Joberty, G., Perlungher, R.R., Sheffield, P.J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T., and Macara, I.G. (2001). Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat. Cell Biol.* *3*, 861–866.
- Johannes, L., and Goud, B. (1998). Surfing on a retrograde wave: how does Shiga toxin reach the endoplasmic reticulum? *Trends Cell Biol.* *8*, 158–162.
- John, C.M., Hite, R.K., Weirich, C.S., Fitzgerald, D.J., Jawhari, H., Faty, M., Schläpfer, D., Kroschewski, R., Winkler, F.K., Walz, T., et al. (2007). The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO J.* *26*, 3296–3307.
- Johnson, E.S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J. Cell Biol.* *147*, 981–994.
- Joo, E., Surka, M.C., and Trimble, W.S. (2007). Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev. Cell* *13*, 677–690.
- Joshi, G., Bekier, M.E., and Wang, Y. (2015). Golgi fragmentation in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* *9*.
- Kaiser, C. (2000). Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 3783–3785.
- Kalikin, L.M., Frank, T.S., Svoboda-Newman, S.M., Wetzel, J.C., Cooney, K.A., and Petty, E.M. (1997). A region of interstitial 17q25 allelic loss in ovarian tumors coincides with a defined region of loss in breast tumors. *Oncogene* *14*, 1991–1994.
- Kalikin, L.M., Sims, H.L., and Petty, E.M. (2000). Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* *63*, 165–172.
- Keller, P., and Simons, K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell Sci.* *110* ( Pt 24), 3001–3009.
- Kierbel, A., Gassama-Diagne, A., Rocha, C., Radoshevich, L., Olson, J., Mostov, K., and Engel, J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* exploits a PIP3-dependent pathway to transform apical into basolateral membrane. *J. Cell Biol.* *177*, 21–27.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *152*, 519–530.
- Kim, C.S., Seol, S.K., Song, O.-K., Park, J.H., and Jang, S.K. (2007). An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J. Virol.* *81*, 3852–3865.
- Kim, J.H., Lee, S.D., Han, J.M., Lee, T.G., Kim, Y., Park, J.B., Lambeth, J.D., Suh, P.G., and Ryu, S.H. (1998). Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Lett.* *430*, 231–235.

- Kim, M.S., Froese, C.D., Estey, M.P., and Trimble, W.S. (2011). SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.* *195*, 815–826.
- Kinoshita, M. (2003). Assembly of mammalian septins. *J. Biochem. (Tokyo)* *134*, 491–496.
- Kinoshita, M. (2006). Diversity of septin scaffolds. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 54–60.
- Kinoshita, M., and Noda, M. (2001). Roles of Septins in the Mammalian Cytokinesis Machinery. *Cell Struct. Funct.* *26*, 667–670.
- Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Noda, M. (1997). Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* *11*, 1535–1547.
- Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F., and Mitchison, T.J. (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell* *3*, 791–802.
- Kinoshita, N., Kimura, K., Matsumoto, N., Watanabe, M., Fukaya, M., and Ide, C. (2004). Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *9*, 1–14.
- Kleizen, B., and Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 343–349.
- Kodani, A., and Sütterlin, C. (2008). The Golgi protein GM130 regulates centrosome morphology and function. *Mol. Biol. Cell* *19*, 745–753.
- Kodani, A., Kristensen, I., Huang, L., and Sütterlin, C. (2009). GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1192–1200.
- Kohlwein, S.D. (2010). Obese and anorexic yeasts: experimental models to understand the metabolic syndrome and lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 222–229.
- Kojima, K., Sakai, I., Hasegawa, A., Niiya, H., Azuma, T., Matsuo, Y., Fujii, N., Tanimoto, M., and Fujita, S. (2004). FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in transformation with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* *18*, 998–1005.
- Kondylis, V., van Nispen tot Pannerden, H.E., Herpers, B., Friggi-Grelin, F., and Rabouille, C. (2007). The golgi comprises a paired stack that is separated at G2 by modulation of the actin cytoskeleton through Abi and Scar/WAVE. *Dev. Cell* *12*, 901–915.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* *80*, 5308–5320.
- Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H.W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D.E., Mann, M., et al. (2011). Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. *Cell Metab.* *14*, 504–515.
- Krekulová, L., Reháč, V., and Riley, L.W. (2006). Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. *Folia Microbiol. (Praha)* *51*, 665–680.
- Kremer, B.E., Haystead, T., and Macara, I.G. (2005). Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4648–4659.
- Kremer, B.E., Adang, L.A., and Macara, I.G. (2007). Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell* *130*, 837–850.
- Kuerschner, L., Moessinger, C., and Thiele, C. (2008). Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic Cph. Den.* *9*, 338–352.
- Kuhlenbäumer, G., Hannibal, M.C., Nelis, E., Schirmacher, A., Verpoorten, N., Meuleman, J., Watts, G.D.J., De Vriendt, E., Young, P., Stögbauer, F., et al. (2005). Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. *Nat. Genet.* *37*, 1044–1046.
- Kuiken, C., and Simmonds, P. (2009). Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *510*, 33–53.
- Kuo, Y.-C., Lin, Y.-H., Chen, H.-I., Wang, Y.-Y., Chiou, Y.-W., Lin, H.-H., Pan, H.-A., Wu, C.-M., Su, S.-M., Hsu, C.-C., et al. (2012). SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Hum. Mutat.* *33*, 710–719.

- Kutateladze, T.G. (2010). Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat. Chem. Biol.* 6, 507–513.
- Lambert, J.E., Bain, V.G., Ryan, E.A., Thomson, A.B.R., and Clandinin, M.T. (2013). Elevated lipogenesis and diminished cholesterol synthesis in patients with hepatitis C viral infection compared to healthy humans. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 1697–1704.
- Larisch, S., Yi, Y., Lotan, R., Kerner, H., Eimerl, S., Tony Parks, W., Gottfried, Y., Birkey Reffey, S., de Caestecker, M.P., Danielpour, D., et al. (2000). A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat. Cell Biol.* 2, 915–921.
- de Lartigue, J., Polson, H., Feldman, M., Shokat, K., Tooze, S.A., Urbé, S., and Clague, M.J. (2009). PIKfyve regulation of endosome-linked pathways. *Traffic* Cph. Den. 10, 883–893.
- Lau, W.-Y., and Lai, E.C.H. (2008). Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. HBPDI* 7, 237–257.
- Lavieu, G., Dunlop, M.H., Lerich, A., Zheng, H., Bottanelli, F., and Rothman, J.E. (2014). The Golgi ribbon structure facilitates anterograde transport of large cargoes. *Mol. Biol. Cell* 25, 3028–3036.
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317, 41–72.
- Levrero, M. (2006). Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25, 3834–3847.
- Lhuillier, P., Rode, B., Escalier, D., Lorès, P., Dirami, T., Bienvenu, T., Gacon, G., Dulioust, E., and Touré, A. (2009). Absence of annulus in human asthenozoospermia: case report. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 1296–1303.
- Li, Q., Pène, V., Krishnamurthy, S., Cha, H., and Liang, T.J. (2013). Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK- $\alpha$  in lipogenesis and viral assembly. *Nat. Med.* 19, 722–729.
- Li, Y., Song, L., Gong, Y., and He, B. (2014). Detection of colorectal cancer by DNA methylation biomarker SEPT9: past, present and future. *Biomark. Med.* 8, 755–769.
- Li, Z., Thiel, K., Thul, P.J., Beller, M., Kühnlein, R.P., and Welte, M.A. (2012). Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos. *Curr. Biol. CB* 22, 2104–2113.
- Liefhebber, J.M.P., Hague, C.V., Zhang, Q., Wakelam, M.J.O., and McLauchlan, J. (2014). Modulation of triglyceride and cholesterol ester synthesis impairs assembly of infectious hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* 289, 21276–21288.
- Lim, W.A., and Richards, F.M. (1994). Critical residues in an SH3 domain from Sem-5 suggest a mechanism for proline-rich peptide recognition. *Nat. Struct. Biol.* 1, 221–225.
- Lin, Y.-H., Lin, Y.-M., Wang, Y.-Y., Yu, I.-S., Lin, Y.-W., Wang, Y.-H., Wu, C.-M., Pan, H.-A., Chao, S.-C., Yen, P.H., et al. (2009). The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis. *Am. J. Pathol.* 174, 1857–1868.
- Lindenbach, B.D. (2013). Virion assembly and release. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 369, 199–218.
- Lofton-Day, C., Model, F., Devos, T., Tetzner, R., Distler, J., Schuster, M., Song, X., Lesche, R., Liebenberg, V., Ebert, M., et al. (2008). DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin. Chem.* 54, 414–423.
- Lohmann, V. (2013). Hepatitis C virus RNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 369, 167–198.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110–113.
- Longtine, M.S., and Bi, E. (2003). Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol.* 13, 403–409.
- Low, C., and Macara, I.G. (2006). Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. *J. Biol. Chem.* 281, 30697–30706.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., et al. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* 380, 2095–2128.

- Lu, D., Sun, H., Wang, H., Barylko, B., Fukata, Y., Fukata, M., Albanesi, J.P., and Yin, H.L. (2012). Phosphatidylinositol 4-Kinase II $\alpha$  Is Palmitoylated by Golgi-localized Palmitoyltransferases in Cholesterol-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* *287*, 21856–21865.
- Lukoyanova, N., Baldwin, S.A., and Trinick, J. (2008). 3D reconstruction of mammalian septin filaments. *J. Mol. Biol.* *376*, 1–7.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* *17*, 589–595.
- Mallet, W.G., and Maxfield, F.R. (1999). Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways. *J. Cell Biol.* *146*, 345–359.
- Manolea, F., Chun, J., Chen, D.W., Clarke, I., Summerfeldt, N., Dacks, J.B., and Melançon, P. (2010). Arf3 is activated uniquely at the trans-Golgi network by brefeldin A-inhibited guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1836–1849.
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A., and Brasaemle, D.L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J. Biol. Chem.* *281*, 11901–11909.
- Marra, P., Salvatore, L., Mironov, A., Di Campi, A., Di Tullio, G., Trucco, A., Beznoussenko, G., Mironov, A., and De Matteis, M.A. (2007). The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1595–1608.
- Martin, G.A., Busch, S.J., Meredith, G.D., Cardin, A.D., Blankenship, D.T., Mao, S.J., Rehtin, A.E., Woods, C.W., Racke, M.M., and Schafer, M.P. (1988). Isolation and cDNA sequence of human postheparin plasma hepatic triglyceride lipase. *J. Biol. Chem.* *263*, 10907–10914.
- Martin, S., Driessen, K., Nixon, S.J., Zerial, M., and Parton, R.G. (2005). Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J. Biol. Chem.* *280*, 42325–42335.
- Martínez-Alonso, E., Tomás, M., and Martínez-Menárguez, J.A. (2013). Morpho-functional architecture of the Golgi complex of neuroendocrine cells. *Neuroendocr. Sci.* *4*, 41.
- Mason, J.M., and Arndt, K.M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *5*, 170–176.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., and Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11285–11290.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 121–132.
- Mayr, E. (1998). Two empires or three? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9720–9723.
- McCartney, A.J., Zhang, Y., and Weisman, L.S. (2014). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *36*, 52–64.
- McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J. Viral Hepat.* *7*, 2–14.
- McMurray, M.A., and Thorner, J. (2009). Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Div.* *4*, 18.
- Medigeschi, G.R., and Schu, P. (2003). Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46. *Traffic Cph. Den.* *4*, 802–811.
- van der Meer, A.J., Wedemeyer, H., Feld, J.J., Dufour, J.-F., Zeuzem, S., Hansen, B.E., and Janssen, H.L.A. (2014). Life expectancy in patients with chronic HCV infection and cirrhosis compared with a general population. *JAMA* *312*, 1927–1928.
- Megonigal, M.D., Rappaport, E.F., Jones, D.H., Williams, T.M., Lovett, B.D., Kelly, K.M., Lerou, P.H., Moulton, T., Budarf, M.L., and Felix, C.A. (1998). t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6413–6418.

- Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2012). MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog.* *8*, e1002829.
- Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., and Barnes, E. (2015). Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *61*, 77–87.
- Meunier, J.-C., Russell, R.S., Engle, R.E., Faulk, K.N., Purcell, R.H., and Emerson, S.U. (2008). Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J. Virol.* *82*, 9647–9656.
- Meyer, H.H. (2005). Golgi reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitin family. *Biochim. Biophys. Acta* *1744*, 481–492.
- Miller, P.M., Folkmann, A.W., Maia, A.R.R., Efimova, N., Efimov, A., and Kaverina, I. (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1069–1080.
- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B., and Echard, A. (2010). Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* *12*, 645–654.
- Mitchell, L., Lau, A., Lambert, J.-P., Zhou, H., Fong, Y., Couture, J.-F., Figeys, D., and Baetz, K. (2011). Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PLoS One* *6*, e25336.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1089–1097.
- Miyoshi, H., Souza, S.C., Zhang, H.-H., Strissel, K.J., Christoffolete, M.A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F.B., Bianco, A.C., Obin, M.S., et al. (2006). Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* *281*, 15837–15844.
- Miyoshi, H., Perfield, J.W., Souza, S.C., Shen, W.-J., Zhang, H.-H., Stancheva, Z.S., Kraemer, F.B., Obin, M.S., and Greenberg, A.S. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 996–1002.
- Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., and Novick, P. (2010). Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev. Cell* *18*, 828–840.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., and Novick, P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 637–659.
- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., and Wiersma, S.T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *57*, 1333–1342.
- Montagna, C., Lyu, M.-S., Hunter, K., Lukes, L., Lowther, W., Reppert, T., Hissong, B., Weaver, Z., and Ried, T. (2003). The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* *63*, 2179–2187.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lohmann, V. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* *78*, 13278–13284.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 453–463.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2009). Cytoskeleton rearrangements during *Listeria* infection: clathrin and septins as new players in the game. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 816–823.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 183–194.
- Mostowy, S., Nam Tham, T., Danckaert, A., Guadagnini, S., Boisson-Dupuis, S., Pizarro-Cerdá, J., and Cossart, P. (2009). Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS One* *4*, e4196.
- Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M.A., Tham, T.N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., et al. (2010).

- Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe* 8, 433–444.
- Mostowy, S., Janel, S., Forestier, C., Roduit, C., Kasas, S., Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., and Lafont, F. (2011a). A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* INVASION PROTEIN InlB and the Met receptor. *Biophys. J.* 100, 1949–1959.
- Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M.A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011b). p62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 26987–26995.
- Murshid, A., and Presley, J.F. (2004). ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 133–145.
- Nagata, K.-I., and Inagaki, M. (2005). Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. *Oncogene* 24, 65–76.
- Nagata, K.-I., Kawajiri, A., Matsui, S., Takagishi, M., Shiromizu, T., Saitoh, N., Izawa, I., Kiyono, T., Itoh, T.J., Hotani, H., et al. (2003). Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *J. Biol. Chem.* 278, 18538–18543.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T.E., and Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* 131, 1715–1726.
- Nguyen, T.Q., Sawa, H., Okano, H., and White, J.G. (2000). The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J. Cell Sci.* 113 Pt 21, 3825–3837.
- Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D.J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M.P., Parsot, C., Sansonetti, P.J., and Payrastre, B. (2002). Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.* 21, 5069–5078.
- Nishihama, R., Onishi, M., and Pringle, J.R. (2011). New Insights into the Phylogenetic Distribution and Evolutionary Origins of the Septins. *Biol. Chem.* 392, 681–687.
- Oegema, K., Desai, A., Wong, M.L., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (1998). Purification and assay of a septin complex from *Drosophila* embryos. *Methods Enzymol.* 298, 279–295.
- Oegema, K., Savoian, M.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2000). Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 150, 539–552.
- Ogata, N., Alter, H.J., Miller, R.H., and Purcell, R.H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3392–3396.
- Okada, S., Leda, M., Hanna, J., Savage, N.S., Bi, E., and Goryachev, A.B. (2013). Daughter cell identity emerges from the interplay of Cdc42, septins, and exocytosis. *Dev. Cell* 26, 148–161.
- Okamoto, H., Kojima, M., Okada, S., Yoshizawa, H., Iizuka, H., Tanaka, T., Muchmore, E.E., Peterson, D.A., Ito, Y., and Mishiro, S. (1992). Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 190, 894–899.
- Okumura, T. (2011). Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J. Physiol. Biochem.* 67, 629–636.
- Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K.-I., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., et al. (2005). Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10965–10978.
- Opat, A.S., Houghton, F., and Gleeson, P.A. (2001). Steady-state localization of a medial-Golgi glycosyltransferase involves transit through the trans-Golgi network. *Biochem. J.* 358, 33–40.
- Osaka, M., Rowley, J.D., and Zeleznik-Le, N.J. (1999). MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6428–6433.
- Owen, D.M., Huang, H., Ye, J., and Gale, M. (2009). Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394, 99–108.

- Palade, G.E., and Porter, K.R. (1954). Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. *J. Exp. Med.* *100*, 641–656.
- Pan, F., Malmberg, R.L., and Momany, M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.* *7*, 103.
- Parvaiz, F., Manzoor, S., Iqbal, J., McRae, S., Javed, F., Ahmed, Q.L., and Waris, G. (2014). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A favors upregulation of gluconeogenic and lipogenic gene expression leading towards insulin resistance: a metabolic syndrome. *Arch. Virol.* *159*, 1017–1025.
- Patterson, G.H., Hirschberg, K., Polishchuk, R.S., Gerlich, D., Phair, R.D., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* *133*, 1055–1067.
- Paul, D., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2014). Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* *16*, 569–579.
- Pawlotsky, J.-M. (2003). Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin. Liver Dis.* *7*, 45–66.
- Pelham, H.R. (1998). Getting through the Golgi complex. *Trends Cell Biol.* *8*, 45–49.
- Pendaries, C., Tronchère, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., Fry, M.J., Gaits-Iacovoni, F., Sansonetti, P.J., and Payrastre, B. (2006). PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *EMBO J.* *25*, 1024–1034.
- Peng, J., Awad, A., Sar, S., Hamze Komaiha, O., Moyano, R., Rayal, A., Samuel, D., Shewan, A., Vanhaesebroeck, B., Mostov, K., et al. (2015). Phosphoinositide 3-kinase p110 $\delta$  promotes lumen formation through the enhancement of apico-basal polarity and basal membrane organization. *Nat. Commun.* *6*, 5937.
- Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.O., Deléage, G., and Pawlotsky, J.M. (2001). Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J. Virol.* *75*, 5703–5710.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* *279*, 40835–40843.
- Peterson, E., and Petty, E. (2010). Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin. Genet.* *77*, 511–524.
- Pfeffer, S.R. (2010). How the Golgi works: a cisternal progenitor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19614–19618.
- Phan, Q.T., Eng, D.K., Mostowy, S., Park, H., Cossart, P., and Filler, S.G. (2013). Role of endothelial cell septin 7 in the endocytosis of *Candida albicans*. *mBio* *4*, e00542-513.
- Pol, A., Gross, S.P., and Parton, R.G. (2014). Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol.* *204*, 635–646.
- Polishchuk, R.S., and Mironov, A.A. (2004). Structural aspects of Golgi function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *61*, 146–158.
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Hélot, L., Rouillé, Y., et al. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.* *7*, e1001278.
- Popescu, C.-I., Riva, L., Vlaicu, O., Farhat, R., Rouillé, Y., and Dubuisson, J. (2014). Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. *Biology* *3*, 892–921.
- Posor, Y., Eichhorn-Gruenig, M., Puchkov, D., Schöneberg, J., Ullrich, A., Lampe, A., Müller, R., Zerbakhsh, S., Gulluni, F., Hirsch, E., et al. (2013). Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* *499*, 233–237.
- Poynard, T., Bedossa, P., and Opolon, P. (1997). Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet Lond. Engl.* *349*, 825–832.
- Poynard, T., Ratziu, V., Charlotte, F., Goodman, Z., McHutchison, J., and Albrecht, J. (2001). Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J. Hepatol.* *34*, 730–739.
- Pringle, J.R. (2008). Origins and Development of the Septin Field. In *The Septins*, P.A. Hall, S.E.H.

- Russell, and J.R. Pringle, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 5–34.
- Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnès, P., and Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J. Cell Sci.* *128*, 207–217.
- Puhar, A., Tronchère, H., Payrastra, B., Nhieu, G.T.V., and Sansonetti, P.J. (2013). A *Shigella* effector dampens inflammation by regulating epithelial release of danger signal ATP through production of the lipid mediator PtdIns5P. *Immunity* *39*, 1121–1131.
- Pusapati, G.V., Luchetti, G., and Pfeffer, S.R. (2012). Ric1-Rgp1 complex is a guanine nucleotide exchange factor for the late Golgi Rab6A GTPase and an effector of the medial Golgi Rab33B GTPase. *J. Biol. Chem.* *287*, 42129–42137.
- Puthenveedu, M.A., Bachert, C., Puri, S., Lanni, F., and Linstedt, A.D. (2006). GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat. Cell Biol.* *8*, 238–248.
- Pyper, S.R., Viswakarma, N., Yu, S., and Reddy, J.K. (2010). PPAR $\alpha$ : energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl. Recept. Signal.* *8*, e002.
- Qi, M., Yu, W., Liu, S., Jia, H., Tang, L., Shen, M., Yan, X., Saiyin, H., Lang, Q., Wan, B., et al. (2005). Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *336*, 994–1000.
- Rambourg, A., and Clermont, Y. (1990). Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.* *51*, 189–200.
- Ramel, D., Lagarrigue, F., Pons, V., Mounier, J., Dupuis-Coronas, S., Chicanne, G., Sansonetti, P.J., Gaïts-Iacovoni, F., Tronchère, H., and Payrastra, B. (2011). *Shigella flexneri* infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling. *Sci. Signal.* *4*, ra61.
- Reed, K.E., and Rice, C.M. (2000). Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *242*, 55–84.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* *9*, 32–45.
- Ren, J., Pei-Chen Lin, C., Pathak, M.C., Temple, B.R.S., Nile, A.H., Mousley, C.J., Duncan, M.C., Eckert, D.M., Leiker, T.J., Ivanova, P.T., et al. (2014). A phosphatidylinositol transfer protein integrates phosphoinositide signaling with lipid droplet metabolism to regulate a developmental program of nutrient stress-induced membrane biogenesis. *Mol. Biol. Cell* *25*, 712–727.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* *122*, 735–749.
- Rios, R.M. (2014). The centrosome–Golgi apparatus nexus. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *369*.
- Rios, R.M., and Bornens, M. (2003). The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 60–66.
- Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M., and Rios, R.M. (2009). Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J.* *28*, 1016–1028.
- Rodal, A.A., Kozubowski, L., Goode, B.L., Drubin, D.G., and Hartwig, J.H. (2005). Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. *Mol. Biol. Cell* *16*, 372–384.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., et al. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* *8*, e1003056.
- Rothman, J.E., and Wieland, F.T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* *272*, 227–234.
- Ruhanen, H., Perttilä, J., Hölttä-Vuori, M., Zhou, Y., Yki-Järvinen, H., Ikonen, E., Käkälä, R., and Olkkonen, V.M. (2014). PNPLA3 mediates hepatocyte triacylglycerol remodeling. *J. Lipid Res.* *55*, 739–746.
- Russell, S.E., McIlhatton, M.A., Burrows, J.F., Donaghy, P.G., Chanduloy, S., Petty, E.M., Kalikin, L.M., Church, S.W., McIlroy, S., Harkin, D.P., et al. (2000). Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q,

- commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* *60*, 4729–4734.
- Sabahi, A., Uprichard, S.L., Wimley, W.C., Dash, S., and Garry, R.F. (2014). Unexpected structural features of the hepatitis C virus envelope protein 2 ectodomain. *J. Virol.* *88*, 10280–10288.
- Sagona, A.P., Nezis, I.P., Pedersen, N.M., Liestøl, K., Poulton, J., Rusten, T.E., Skotheim, R.I., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2010). PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat. Cell Biol.* *12*, 362–371.
- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastra, B., Bourguet, W., Antonny, B., and Drin, G. (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* *195*, 965–978.
- Saka, H.A., and Valdivia, R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 411–437.
- Sakai, A., Kaneko, S., Honda, M., Matsushita, E., and Kobayashi, K. (1999). Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatol. Baltim. Md* *30*, 556–561.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11646–11651.
- Sakata, K., Hara, M., Terada, T., Watanabe, N., Takaya, D., Yaguchi, S., Matsumoto, T., Matsuura, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., et al. (2013). HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- $\beta$  type I receptor. *Sci. Rep.* *3*, 3243.
- Salamon, R.S., and Backer, J.M. (2013). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate: tool of choice for class I PI 3-kinases. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *35*, 602–611.
- Salloum, S., Wang, H., Ferguson, C., Parton, R.G., and Tai, A.W. (2013). Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets. *PLoS Pathog.* *9*, e1003513.
- Sanan, D.A., Fan, J., Bensadoun, A., and Taylor, J.M. (1997). Hepatic lipase is abundant on both hepatocyte and endothelial cell surfaces in the liver. *J. Lipid Res.* *38*, 1002–1013.
- Sandrock, K., Bartsch, I., Bläser, S., Busse, A., Busse, E., and Zieger, B. (2011). Characterization of human septin interactions. *Biol. Chem.* *392*, 751–761.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 430–434.
- Sarkes, D., and Rameh, L.E. (2010). A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *Biochem. J.* *428*, 375–384.
- Sbrissa, D., Ikononov, O.C., and Shisheva, A. (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization. *J. Biol. Chem.* *277*, 6073–6079.
- Sbrissa, D., Ikononov, O.C., Strakova, J., and Shisheva, A. (2004). Role for a novel signaling intermediate, phosphatidylinositol 5-phosphate, in insulin-regulated F-actin stress fiber breakdown and GLUT4 translocation. *Endocrinology* *145*, 4853–4865.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* *21*, 5017–5025.
- Scherer, P.E. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* *55*, 1537–1545.
- Schink, K.O., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2013). Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *35*, 900–912.
- Schlachterman, A., Craft, W.W., Hilgenfeldt, E., Mitra, A., and Cabrera, R. (2015). Current and future treatments for hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *21*, 8478–8491.
- Schmidt, K., and Nichols, B.J. (2004). A barrier to lateral diffusion in the cleavage furrow of dividing mammalian cells. *Curr. Biol. CB* *14*, 1002–1006.

- Schmitz, K.R., Liu, J., Li, S., Setty, T.G., Wood, C.S., Burd, C.G., and Ferguson, K.M. (2008). Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer. *Dev. Cell* *14*, 523–534.
- Schrag, J.D., Procopio, D.O., Cygler, M., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J.M. (2003). Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 49–57.
- Scott, M., Hyland, P.L., McGregor, G., Hillan, K.J., Russell, S.E.H., and Hall, P.A. (2005). Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. *Oncogene* *24*, 4688–4700.
- Scott, M., McCluggage, W.G., Hillan, K.J., Hall, P.A., and Russell, S.E.H. (2006). Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *118*, 1325–1329.
- Seemann, J., Pypaert, M., Taguchi, T., Malsam, J., and Warren, G. (2002). Partitioning of the matrix fraction of the Golgi apparatus during mitosis in animal cells. *Science* *295*, 848–851.
- Sellin, M.E., Sandblad, L., Stenmark, S., and Gullberg, M. (2011). Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol. Biol. Cell* *22*, 3152–3164.
- Shankar, J., Messenberg, A., Chan, J., Underhill, T.M., Foster, L.J., and Nabi, I.R. (2010). Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *Cancer Res.* *70*, 3780–3790.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., and Bartenschlager, R. (2007). The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J. Biol. Chem.* *282*, 37158–37169.
- Sheffield, P.J., Oliver, C.J., Kremer, B.E., Sheng, S., Shao, Z., and Macara, I.G. (2003). Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *J. Biol. Chem.* *278*, 3483–3488.
- Shewan, A.M., van Dam, E.M., Martin, S., Luen, T.B., Hong, W., Bryant, N.J., and James, D.E. (2003). GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. *Mol. Biol. Cell* *14*, 973–986.
- Shima, D.T., Cabrera-Poch, N., Pepperkok, R., and Warren, G. (1998). An ordered inheritance strategy for the Golgi apparatus: visualization of mitotic disassembly reveals a role for the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* *141*, 955–966.
- Shimizu, Y.K., Igarashi, H., Kanematu, T., Fujiwara, K., Wong, D.C., Purcell, R.H., and Yoshikura, H. (1997). Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J. Virol.* *71*, 5769–5773.
- Shin, H.-W., and Nakayama, K. (2004). Dual control of membrane targeting by PtdIns(4)P and ARF. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 513–515.
- Shisheva, A. (2013). PtdIns5P: news and views of its appearance, disappearance and deeds. *Arch. Biochem. Biophys.* *538*, 171–180.
- Short, B., Preisinger, C., Schaletzky, J., Kopajtich, R., and Barr, F.A. (2002). The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr. Biol. CB* *12*, 1792–1795.
- Singaravelu, R., Chen, R., Lyn, R.K., Jones, D.M., O'Hara, S., Rouleau, Y., Cheng, J., Srinivasan, P., Nasheri, N., Russell, R.S., et al. (2014). Hepatitis C virus induced up-regulation of microRNA-27: a novel mechanism for hepatic steatosis. *Hepatology*. *Baltim. Md* *59*, 98–108.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kühmann, D., Macara, I.G., Weyand, M., Stark, H., and Wittinghofer, A. (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* *449*, 311–315.
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Zent, E., and Wittinghofer, A. (2009). GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16592–16597.
- Sitz, J.H., Baumgärtel, K., Hämmerle, B., Papadopoulos, C., Hekerman, P., Tejedor, F.J., Becker, W., and Lutz, B. (2008). The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. *Neuroscience* *157*, 596–605.

- Skinner, J.R., Shew, T.M., Schwartz, D.M., Tzekov, A., Lopus, C.M., Abumrad, N.A., and Wolins, N.E. (2009). Diacylglycerol Enrichment of Endoplasmic Reticulum or Lipid Droplets Recruits Perilipin 3/TIP47 during Lipid Storage and Mobilization. *J. Biol. Chem.* *284*, 30941–30948.
- Slessareva, J.E., Routt, S.M., Temple, B., Bankaitis, V.A., and Dohlman, H.G. (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* *126*, 191–203.
- Slusarewicz, P., Nilsson, T., Hui, N., Watson, R., and Warren, G. (1994). Isolation of a matrix that binds medial Golgi enzymes. *J. Cell Biol.* *124*, 405–413.
- Smith, C., Dolat, L., Angelis, D., Forgacs, E., Spiliotis, E.T., and Galkin, V.E. (2015). Septin 9 Exhibits Polymorphic Binding to F-Actin and Inhibits Myosin and Cofilin Activity. *J. Mol. Biol.*
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* *149*, 901–914.
- Sørensen, A.B., Lund, A.H., Ethelberg, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Pedersen, F.S. (2000). Sint1, a common integration site in SL3-3-induced T-cell lymphomas, harbors a putative proto-oncogene with homology to the septin gene family. *J. Virol.* *74*, 2161–2168.
- Spiliotis, E.T., and Nelson, W.J. (2006). Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J. Cell Sci.* *119*, 4–10.
- Spiliotis, E.T., Kinoshita, M., and Nelson, W.J. (2005). A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science* *307*, 1781–1785.
- Spiliotis, E.T., Hunt, S.J., Hu, Q., Kinoshita, M., and Nelson, W.J. (2008). Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J. Cell Biol.* *180*, 295–303.
- Stanbery, L., D’Silva, N.J., Lee, J.S., Bradford, C.R., Carey, T.E., Prince, M.E., Wolf, G.T., Worden, F.P., Cordell, K.G., and Petty, E.M. (2010). High SEPT9\_v1 Expression Is Associated with Poor Clinical Outcomes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Transl. Oncol.* *3*, 239–245.
- Stapleford, K.A., and Lindenbach, B.D. (2011). Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J. Virol.* *85*, 1706–1717.
- Starr, T., Sun, Y., Wilkins, N., and Storrie, B. (2010). Rab33b and Rab6 are functionally overlapping regulators of Golgi homeostasis and trafficking. *Traffic Cph. Den.* *11*, 626–636.
- Stenmark, H., and Gillooly, D.J. (2001). Intracellular trafficking and turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Semin. Cell Dev. Biol.* *12*, 193–199.
- Sudo, K., Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., Asano, T., and Nagata, K. (2007). SEPT9 sequence alternations causing hereditary neuralgic amyotrophy are associated with altered interactions with SEPT4/SEPT11 and resistance to Rho/Rhotekin-signaling. *Hum. Mutat.* *28*, 1005–1013.
- Sun, Y., Thapa, N., Hedman, A.C., and Anderson, R.A. (2013). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: targeted production and signaling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *35*, 513–522.
- Sundaram, M., and Yao, Z. (2010). Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutr. Metab.* *7*, 35.
- Surka, M.C., Tsang, C.W., and Trimble, W.S. (2002). The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3532–3545.
- Suzuki, R., Matsuda, M., Watashi, K., Aizaki, H., Matsuura, Y., Wakita, T., and Suzuki, T. (2013). Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog.* *9*, e1003589.
- Tai, C.L., Chi, W.K., Chen, D.S., and Hwang, L.H. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* *70*, 8477–8484.
- Takahashi, Y., Iwase, M., Konishi, M., Tanaka, M., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. (1999). Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *259*, 582–587.

- Takahashi, Y., Toh-E, A., and Kikuchi, Y. (2003). Comparative analysis of yeast PIAS-type SUMO ligases in vivo and in vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* *133*, 415–422.
- Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M., and Takiguchi, K. (2009). Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol. CB* *19*, 140–145.
- Taniguchi, M., Taoka, M., Itakura, M., Asada, A., Saito, T., Kinoshita, M., Takahashi, M., Isobe, T., and Hisanaga, S. (2007). Phosphorylation of adult type Sept5 (CDCrel-1) by cyclin-dependent kinase 5 inhibits interaction with syntaxin-1. *J. Biol. Chem.* *282*, 7869–7876.
- Targett-Adams, P., Boulant, S., and McLauchlan, J. (2008). Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* *82*, 2182–2195.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* *279*, 48576–48587.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* *435*, 374–379.
- Thiam, A.R., Farese, R.V., and Walther, T.C. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 775–786.
- Thiele, C., and Spandl, J. (2008). Cell biology of lipid droplets. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 378–385.
- Thomssen, R., Bonk, S., and Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *182*, 329–334.
- Tokhtaeva, E., Capri, J., Marcus, E.A., Whitelegge, J.P., Khuzakhmetova, V., Bukharaeva, E., Deiss-Yehiely, N., Dada, L.A., Sachs, G., Fernandez-Salas, E., et al. (2015). Septin Dynamics Are Essential for Exocytosis. *J. Biol. Chem.* *290*, 5280–5297.
- Tooley, A.J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W.S., Kinoshita, M., and Krummel, M.F. (2009). Amoeboid T lymphocytes Require the Septin Cytoskeleton for Cortical Integrity and Persistent Motility. *Nat. Cell Biol.* *11*, 17–26.
- Tóth, K., Galamb, O., Spisák, S., Wichmann, B., Sipos, F., Valcz, G., Leiszter, K., Molnár, B., and Tulassay, Z. (2011). The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol. Oncol. Res. POR* *17*, 503–509.
- Trotard, M., Lepère-Douard, C., Régeard, M., Piquet-Pellorce, C., Lavillette, D., Cosset, F.-L., Gripon, P., and Le Seyec, J. (2009). Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 3780–3789.
- Tsang, C.W., Fedchyshyn, M., Harrison, J., Xie, H., Xue, J., Robinson, P.J., Wang, L.-Y., and Trimble, W.S. (2008). Superfluous role of mammalian septins 3 and 5 in neuronal development and synaptic transmission. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 7012–7029.
- Tsang, C.W., Estey, M.P., DiCiccio, J.E., Xie, H., Patterson, D., and Trimble, W.S. (2011). Characterization of presynaptic septin complexes in mammalian hippocampal neurons. *Biol. Chem.* *392*, 739–749.
- Tseng, C.-T.K., and Klimpel, G.R. (2002). Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J. Exp. Med.* *195*, 43–49.
- Turner, F.R., and Whaley, W.G. (1965). INTERCISTERNAL ELEMENTS OF THE GOLGI APPARATUS. *Science* *147*, 1303–1304.
- Valente, C., and Colanzi, A. (2015). Mechanisms and Regulation of the Mitotic Inheritance of the Golgi Complex. *Front. Cell Dev. Biol.* *3*.
- Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccalà, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P., and Bartenschlager, R. (2008). Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J. Virol.* *82*, 11503–11515.
- Vasudevan, K.M., and Garraway, L.A. (2010). AKT signaling in physiology and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *347*, 105–133.
- Veenendaal, T., Jarvela, T., Grieve, A.G., van Es, J.H., Linstedt, A.D., and Rabouille, C. (2014). GRASP65 controls the cis Golgi integrity in vivo. *Biol. Open* *3*, 431–443.

- Verhoeven, A.J., Neve, B.P., and Jansen, H. (2000). Intracellular activation of rat hepatic lipase requires transport to the Golgi compartment and is associated with a decrease in sedimentation velocity. *J. Biol. Chem.* *275*, 9332–9339.
- Versele, M., and Thorner, J. (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol.* *15*, 414–424.
- Versele, M., Gullbrand, B., Shulewitz, M.J., Cid, V.J., Bahmanyar, S., Chen, R.E., Barth, P., Alber, T., and Thorner, J. (2004). Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *15*, 4568–4583.
- Viaud, J., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastra, B. (2012). Regulation of the DH-PH tandem of guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases by phosphoinositides. *Adv. Biol. Regul.* *52*, 303–314.
- Viaud, J., Boal, F., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastra, B. (2014a). Phosphatidylinositol 5-phosphate: a nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *36*, 260–272.
- Viaud, J., Lagarrigue, F., Ramel, D., Allart, S., Chicanne, G., Ceccato, L., Courilleau, D., Xuereb, J.-M., Pertz, O., Payrastra, B., et al. (2014b). Phosphatidylinositol 5-phosphate regulates invasion through binding and activation of Tiam1. *Nat. Commun.* *5*, 4080.
- Viaud, J., Mansour, R., Antkowiak, A., Mujalli, A., Valet, C., Chicanne, G., Xuereb, J.-M., Terrisse, A.-D., Séverin, S., Gratacap, M.-P., et al. (2015). Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie*.
- Vicinanza, M., Korolchuk, V.I., Ashkenazi, A., Puri, C., Menzies, F.M., Clarke, J.H., and Rubinsztein, D.C. (2015). PI(5)P regulates autophagosome biogenesis. *Mol. Cell* *57*, 219–234.
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., and Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J. Virol.* *84*, 10159–10168.
- Vinogradova, T., Paul, R., Grimaldi, A.D., Loncarek, J., Miller, P.M., Yampolsky, D., Magidson, V., Khodjakov, A., Mogilner, A., and Kaverina, I. (2012). Concerted effort of centrosomal and Golgi-derived microtubules is required for proper Golgi complex assembly but not for maintenance. *Mol. Biol. Cell* *23*, 820–833.
- Vogt, D.A., Camus, G., Herker, E., Webster, B.R., Tsou, C.-L., Greene, W.C., Yen, T.-S.B., and Ott, M. (2013). Lipid Droplet-Binding Protein TIP47 Regulates Hepatitis C Virus RNA Replication through Interaction with the Viral NS5A Protein. *PLoS Pathog.* *9*.
- Wältermann, M., and Steinbüchel, A. (2005). Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J. Bacteriol.* *187*, 3607–3619.
- Walther, T.C., and Farese, R.V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 687–714.
- Wandeler, G., Dufour, J.-F., Bruggmann, P., and Rauch, A. (2015). Hepatitis C: a changing epidemic. *Swiss Med. Wkly.* *145*, w14093.
- Wang, H., Bell, M., Sreenivasan, U., Sreenevasan, U., Hu, H., Liu, J., Dalen, K., Londos, C., Yamaguchi, T., Rizzo, M.A., et al. (2011). Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 15707–15715.
- Wang, Y., Satoh, A., and Warren, G. (2005). Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *J. Biol. Chem.* *280*, 4921–4928.
- Wei, Y.J., Sun, H.Q., Yamamoto, M., Wlodarski, P., Kunii, K., Martinez, M., Barylko, B., Albanesi, J.P., and Yin, H.L. (2002). Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP. *J. Biol. Chem.* *277*, 46586–46593.
- Weickert, M.O., and Pfeiffer, A.F.H. (2006). Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* *49*, 1732–1741.
- Weide, T., Bayer, M., Köster, M., Siebrasse, J.P., Peters, R., and Barnekow, A. (2001). The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b. *EMBO Rep.* *2*, 336–341.
- Weirich, C.S., Erzberger, J.P., and Barral, Y. (2008). The septin family of GTPases: architecture

- and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 478–489.
- Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Meerovitch, K., and Pause, A. (2005). Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *J. Biol. Chem.* *280*, 29604–29611.
- Welch, M.D., and Way, M. (2013). Arp2/3-mediated actin-based motility: a tail of pathogen abuse. *Cell Host Microbe* *14*, 242–255.
- Welsch, C., Jesudian, A., Zeuzem, S., and Jacobson, I. (2012). New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* *61 Suppl 1*, i36-46.
- Welte, M.A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol.* *CB 25*, R470-481.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* *384*, 432–438.
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J.T., Kraemer, N., Gould, T.J., Uchida, A., Cheng, J.-X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., et al. (2013). Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev. Cell* *24*, 384–399.
- Williams, D., Hicks, S.W., Machamer, C.E., and Pessin, J.E. (2006). Golgin-160 is required for the Golgi membrane sorting of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes. *Mol. Biol. Cell* *17*, 5346–5355.
- Wood, C.S., Schmitz, K.R., Bessman, N.J., Setty, T.G., Ferguson, K.M., and Burd, C.G. (2009). PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *J. Cell Biol.* *187*, 967–975.
- Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog.* *6*, e1001087.
- Wullschleger, S., Wasserman, D.H., Gray, A., Sakamoto, K., and Alessi, D.R. (2011). Role of TAPP1 and TAPP2 adaptor binding to PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> in regulating insulin sensitivity defined by knock-in analysis. *Biochem. J.* *434*, 265–274.
- Xiang, Y., and Wang, Y. (2010). GRASP55 and GRASP65 play complementary and essential roles in Golgi cisternal stacking. *J. Cell Biol.* *188*, 237–251.
- Xiang, Y., and Wang, Y. (2011). New components of the Golgi matrix. *Cell Tissue Res.* *344*, 365–379.
- Xiang, Y., Zhang, X., Nix, D.B., Katoh, T., Aoki, K., Tiemeyer, M., and Wang, Y. (2013). Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. *Nat. Commun.* *4*, 1659.
- Xue, J., Wang, X., Malladi, C.S., Kinoshita, M., Milburn, P.J., Lengyel, I., Rostas, J.A., and Robinson, P.J. (2000). Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 10047–10056.
- Xue, J., Tsang, C.W., Gai, W.-P., Malladi, C.S., Trimble, W.S., Rostas, J.A.P., and Robinson, P.J. (2004). Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *J. Neurochem.* *91*, 579–590.
- Yadav, S., Puthenveedu, M.A., and Linstedt, A.D. (2012). Golgin160 recruits the dynein motor to position the Golgi apparatus. *Dev. Cell* *23*, 153–165.
- Yang, P., and Subbaiah, P.V. (2015). Regulation of hepatic lipase activity by sphingomyelin in plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 1327–1336.
- Yang, H., Galea, A., Sytnyk, V., and Crossley, M. (2012). Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 509–516.
- Yang, Y.-M., Fedchyshyn, M.J., Grande, G., Aitoubah, J., Tsang, C.W., Xie, H., Ackerley, C.A., Trimble, W.S., and Wang, L.-Y. (2010). Septins regulate developmental switching from microdomain to nanodomain coupling of Ca<sup>2+</sup> influx to neurotransmitter release at a central synapse. *Neuron* *67*, 100–115.
- Young, J., Stauber, T., del Nery, E., Vernos, I., Pepperkok, R., and Nilsson, T. (2005). Regulation of microtubule-dependent recycling at the trans-Golgi network by Rab6A and Rab6A'. *Mol. Biol. Cell* *16*, 162–177.

Zechner, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Lass, A., and Zimmermann, R. (2005). Lipolysis: pathway under construction. *Curr. Opin. Lipidol.* *16*, 333–340.

Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., and Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* *15*, 279–291.

Zein, N.N. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*, 223–235.

Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P.S., Grinstein, S., and Trimble, W.S. (1999). Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol. CB* *9*, 1458–1467.

Zhang, Y., Zolov, S.N., Chow, C.Y., Slutsky, S.G., Richardson, S.C., Piper, R.C., Yang, B., Nau, J.J., Westrick, R.J., Morrison, S.J., et al. (2007). Loss of Vac14, a regulator of the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, results in neurodegeneration in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17518–17523.

Zhu, M., Wang, F., Yan, F., Yao, P.Y., Du, J., Gao, X., Wang, X., Wu, Q., Ward, T., Li, J., et al. (2008). Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J. Biol. Chem.* *283*, 18916–18925.

Zolov, S.N., Bridges, D., Zhang, Y., Lee, W.-W., Riehle, E., Verma, R., Lenk, G.M., Converso-Baran, K., Weide, T., Albin, R.L., et al. (2012). In vivo, Pikfyve generates PI(3,5)P<sub>2</sub>, which serves as both a signaling lipid and the major precursor for PI5P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17472–17477.

Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H.J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R.G., Xiao, F., Turek, M., et al. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* *13*, 302–313.

Zoulim, F., Liang, T.J., Gerbes, A.L., Aghemo, A., Deuffic-Burban, S., Dusheiko, G., Fried, M.W., Pol, S., Rockstroh, J.K., Terrault, N.A., et al. (2015). Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut* *64*, 1824–1833.