

LES MICROTUBULES ET LEURS FONCTIONS. ACQUISITIONS RECENTES

PIERRE DUSTIN

*Laboratoire d'Anatomie pathologique.
Université libre de Bruxelles*

Rebut Abril 1982

L'autor recorda les principals propietats dels microtúbulus (MT) i de les seves proteïnes constitutives –tubulines i proteïnes associades (MAPs). Fa una anàlisi de la problemàtica plantejada per l'acoblament *in vivo* i *in vitro* dels MT, el paper que juga el MAP1 i el MAP2 així com el factor *tau*, el significat de la tisolització de la tubulina, les relacions entre guanin-nucleotides i l'acoblament. Es subratlla la importància del calci i de la calmodulina, a la vegada que es discuteix el paper dels centres organitzadors (MTOC) i la polaritat dels MT.

Es fa una anàlisi de com actuen una sèrie d'inhibidors de la formació del MT, com ara la tradicional colchicina, si be es qüestiona la seva participació en l'acoblament dels MT i la seva possible intervenció en l'estimulació de la síntesi de l'ADN i de la mitosi. A la vegada es fa referència al taxol com agent estabilitzador dels MT i la importància que té en el moment de la fixació de les mostres biològiques pel seu estudi en microscòpia electrònica.

Tot seguit es fa una revisió del paper dels MT en la formació del citoesquelet i llur funcionament en determinats models cel·lulars: melanòfors, cèl·lules secretores, el transport axonal, el funcionament dels axópodes i la locomoció dels espermatozoides.

Una relació bibliogràfica actualitzada amb 226 referències sobre microtúbuls posa punt final al treball.

SOMMAIRE

1. Tubulines, microtubules, protéines associées.
 - 1.1. La molécule de tubuline
 - 1.2. Les protéines associées aux MT (MAPs)
 - 1.3. Rôle des guanosine-nucléotides
 - 1.4. Rôle du calcium
 - 1.5. Les centres organisateurs des MT
 - 1.6. Autres formes d'assemblage des tubulines
2. Poisons des MT
 - 2.1. La colchicine
 - 2.2. Les alcaloïdes de la Pervenche
 - 2.3. Les dérivés de la résine de Podophyllum
 - 2.4. Les dérivés du benzimidazole
 - 2.5. Autres poisons chimiques
 - 2.6. Action du froid
 - 2.7. Le taxol: une "anticolchicine"
3. MT, cytosquelette et forme
 - 3.1. L'actine et les IMF
 - 3.2. Relations entre IMF et MT
 - 3.3. Quelques exemples de forme liée aux MT
 - a. les érythrocytes
 - b. les plaquettes
 - c. les spermatozoïdes
 - d. les cellules végétales
 - e. les Protozoaires
 - 3.4. Conclusions
4. Microtubules et mouvements cellulaires
 - 4.1. Mouvements des granules pigmentaires
 - 4.2. Cellules sécrétoires
 - 4.3. Le transport neuroplasmique
 - 4.4. Les axopodes
 - 4.5. Les mouvements ciliaires
 - 4.6. Conclusions.
5. MT et mitose
 - 5.1. Polarité des MT du fuseau
 - 5.2. Le cytosquelette pendant la mitose
 - 5.3. Autres protéines associées au fuseau
 - 5.4. Rôle du calcium et de la calmoduline
 - 5.5. Mécanisme des mouvements mitotiques
6. Résumé

L'histoire des microtubules est un des chapitres les plus fascinants de la biologie moderne. Elle commence par la découverte de substances capables d'altérer l'évolution de la mitose en détruisant les structures fusoriales. La plus connue de celles-ci est la *colchicine*, vieux médicament spécifique de la goutte, et dont l'action cellulaire fut démontrée par Albert Dustin et Franz Lits dès 1934 (56). Cette action, caractérisée par l'accumulation des mitoses dans les zones germinatives, était identique à celle découverte cinq ans auparavant dans le même Laboratoire par Piton (151). L'utilisation de colchicine tritiée allait montrer, entre les mains d'un groupe de chercheurs dirigés par Taylor, à Chicago, en 1965 (195) que cette molécule se fixait électivement sur un groupe particulier de protéines, qui, à la surprise des chercheurs, était particulièrement abondants dans le cerveau (213). Les progrès de la microscopie électronique, à la même époque, révélaient que de nombreuses cellules contenaient des organites tubulaires –les microtubules– (MT) et que ceux-ci étaient identiques aux neurotubules, ce qui expliquait la richesse du tissu nerveux en tubuline.

Microtubules et tubulines furent ensuite retrouvés dans les espèces animales les plus variées, et dans le groupe des Eucaryotes, les tubulines apparaissaient être des molécules apparues très tôt dans l'évolution, et qui avaient subi relativement peu de modifications, puisque des tubulines d'invertébrés pouvaient s'associer à celles de vertébrés pour former des structures tubulaires tout à fait normales. La présence de MT chez les Procaryotes demeure encore un sujet de discussion.

La littérature consacrée aux MT, depuis vingt ans, a cru à une allure presque expo-

nentielle, et près de 600 travaux sont publiés chaque année. Des renseignements détaillés peuvent être trouvés dans deux monographies récentes consacrées aux MT (Dustin, (58) et Roberts et Hyams, (162)). Depuis d'importantes découvertes ont été relatées dans la littérature cytologique et biochimique.

En préparant les textes des leçons données en 1982 à Barcelone, j'ai pensé surtout important de rappeler quels étaient actuellement les grands problèmes posés par l'étude des tubulines et des MT, et de donner un aperçu –forcément incomplet– des acquisitions de ces dernières années, c'est à dire postérieures à la rédaction de la monographie publiée en 1978.

Il n'est pas possible, dans les limites de ce texte, de discuter tous les aspects fonctionnels des MT. C'est pourquoi cinq grands chapitres seront passés en revue: la nature des tubulines et leur mode d'assemblage en microtubules; le mode d'action des agents chimiques qui comme la colchicine inhibent spécifiquement cet assemblage; les relations des microtubules avec les autres composants du cytosquelette; les relations entre MT et mouvements intracellulaire, tel le flux axonal; enfin, le rôle des MT dans la mitose et leur participation aux mouvements des chromosomes.

1. Tubulines, microtubules, protéines associées

On appelle microtubules (Slautterback (183)) des structures tubulaires d'environ 25 nm de diamètre, avec une paroi épaisse de 5 nm et une lumière creuse (pouvant, dans certaines circonstances, par exemple dans les doublets des flagelles, contenir une densité centrale dont on ignore la nature et la signification). Isolés, ces tubules, dont la longueur peut être considérable, se

présentent comme des structures rectilignes, et leur étude fine par des méthodes de contraste négatif, montre qu'elles sont formées de protofilaments en général au nombre de 13 –constituées de sous-unités. L'étude des nerfs a permis une certaine appréciation, par coupes sériées, de la longueur des MT: Tsukita et Ishikawa (205) ont montré, dans le nerf saphène de la souris, que des MT peuvent être continus sur un trajet de 10 μ m. Une extrapolation par le calcul conduit à estimer leur longueur moyenne entre 370 et 760 μ m, ce qui est considérablement plus grand que leur diamètre. Toutefois, l'idée émise précédemment par Weiss (214) que les MT des nerfs seraient aussi longs que ceux-ci et atteindraient ainsi dans certains cas plus d'un m ne peut être confirmée.

Contrairement aux MT observés *in vitro*, la coloration de ces structures par des anticorps spécifiques a montré que dans la cellule intacte, en dehors de la mitose, les MT cheminaient souvent de façon irrégulière, formant un réseau de fibres non bifurquées qui paraissait prendre naissance au voisinage des centrioles (chez les animaux). On parle alors de centres organisateurs des MT (MTOC): nous y reviendrons plus loin. Des expériences récentes ont permis de mieux comprendre pourquoi les MT sont courbés, dans les cellules, et droits lorsqu'ils sont isolés: si l'on place des cellules traitées par des détergents dans une solution de tubuline, dans des conditions propice à l'assemblage des MT, on constate que ceux-ci s'allongent, débordent de la cellule, et sont alors rectilignes (Burton (31)). Cette différence s'explique par le fait que dans la cellule les MT ne sont pas isolés, mais liés entr'eux et éventuellement à d'autres constituants du cytosquelette par d'autres protéines. Nous verrons dans un instant l'importance de ces "MAPs" (microtubule-associated proteins).

1.1. La molécule de tubuline

Comme l'indiquent les observations de morphologie fine, les MT sont formés de sous-unités, disposées de façon hélicoïdale: les problèmes posés par l'assemblage des MT à partir des éléments constitutifs que sont les molécules de tubuline sont l'objet de nombreux travaux et posent des questions complexes en rapport avec la thermodynamique, les activités enzymatiques associées, la structure paracrystalline du réseau hélicoïdal, etc... Ces sous-unités sont au nombre de deux: les tubulines α et β , qui se distinguent par une légère différence de leur vitesse d'électrophorèse, mais sont des protéines très voisines, dont la séquence d'acides aminés est pratiquement connue actuellement (cf. Luduena (119); Cleveland et Kirshner (36); Ponstingl *et al* (152)). Ces deux tubulines montrent une identité de près de 50 % de leurs acides aminés. Elles se retrouvent toutes deux dans les cellules les plus variées, bien que des différences existent dans certaines espèces inférieures, telles que les levures et les Protozoaires. Les deux tubulines forment un dimère $\alpha\beta$, et c'est celui-ci, d'un poids moléculaire de 110,000, qui constitue l'élément à partir duquel seront édifiés les MT.

Ces dimères de tubuline, pour former des MT, doivent posséder des sites d'assemblage longitudinaux et transversaux, et présentent aussi une polarité. De plus, on peut y identifier des sites particuliers où se fixent d'une part deux molécules de GTP de l'autre, des poisons du groupe de la colchicine et de la podophyllotoxine, et enfin ceux du groupe de la vinblastine. Le tableau 1 donne quelques faits relatifs aux différences physiologiques des deux tubulines. Il convient de noter ici que le nombre exact de tubulines est probablement plus élevé. Au point de vue génétique, on a

montré, par l'étude du cDNA préparé à partir de cellules riches en mRNA pour la tubuline (cerveau embryonnaire), que plusieurs gènes, situés sur plusieurs chromosomes, étaient présents pour les tubulines α et β (Cleveland *et al* (37); Cleveland et Kirshner (36)).

TABLEAU 1. Tubulines α et β

Fixation de la colchicine	α
Tyrosilation	α
Site E pour GTP	β
Groupe-SH	α et β
Fixation de la vinblastine	α et β

Une particularité curieuse de la tubuline α est sa tyrosilation dans les cellules de mammifères et de tous les vertébrés étudiés, alors que ce phénomène est inconnu chez les invertébrés (Preston *et al.* (156)). Il s'agit d'un phénomène post-transcriptionnel, lié à l'activité d'une tubuline-tyrosine ligase spécifique (cf. Raybin et Flavin (158)). De nombreux travaux ont été consacrés à cette tyrosilation, dont on ignore le rôle physiologique. Le phénomène est d'autant plus surprenant que la tubuline α native a, à l'extrémité C-terminale de sa chaîne, une molécule de tyrosine qui apparemment est d'abord enlevée avant la tyrosilation. On pense qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme régulateur (Cleveland et Kirshner (36)).

Comme nous l'avons dit, les deux tubulines α et β ont des séquences d'acides aminés voisines. Elles présentent toutes deux plusieurs (une douzaine) de groupes sulhydryles, dont deux paraissent indispensables à leur assemblage en MT (*vide infra*). La partie C-terminale se caractérise par l'accumulation de molécules d'acide glutamique, ce qui confère aux tubulines un caractère très acide, et pourrait expliquer des changements rapides de forme en relation avec les conditions environnantes. Nous

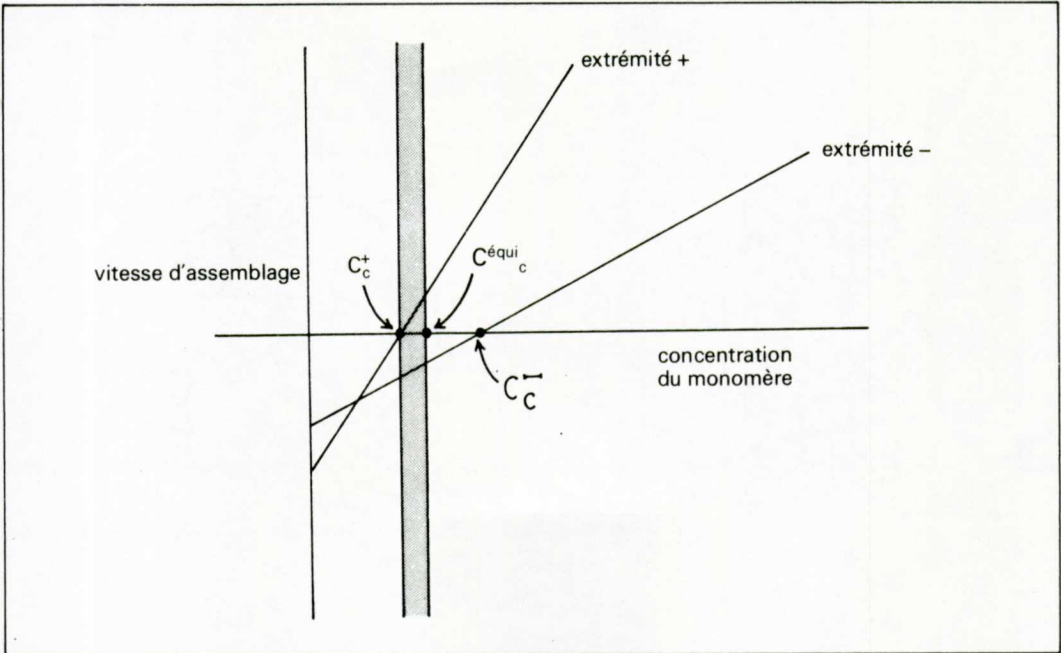


Fig. 1. Influence de la concentration sur l'assemblage des sous-unités de tubuline aux extrémités + et - des MT (*in vitro*). L'assemblage est une fonction de la concentration critique des monomères (C_c^+) dont la pente est différente à l'extrémité + de celle de l'extrémité - (C_c^-). Il existe un point d'équilibre C_c^{equi} qui correspond à un équilibre entre le nombre de nouvelles unités assemblées et désassemblées. Il y a alors un état stable avec "treadmilling". La zone ombrée correspond aux limites de concentrations où l'élongation peut se faire à l'extrémité +, tandis que le désassemblage se poursuit à l'autre extrémité (d'après Kirshner, 1980).

donnons ici, d'après Ponstingl *et al.* (152) la suite des derniers acides aminés de la tubuline α :

30 20
ala-arg-glu-asp-met-ala-ala-leu-
-glu-lys-asp-tyr-glu-glu-val-gly-
10 1
-val-asp-ser-val-glu-gly-glu-gly-
-glu-glu-glu-gly-glu-glu(-Tyr).

Comment s'assemblent les molécules de la tubuline? Ce problème fondamental a été éclairé par la découverte (Weisenberg

(211)) que dans des conditions appropriées, la tubuline pouvait s'assembler en MT *in vitro*. Ces conditions sont une certaine concentration critique, la présence d'ions Mg^{2+} et un taux très faible de Ca^{2+} (nous verrons plus loin l'importance du rôle du Ca^{2+} dans la cellule). De nombreux travaux ont été consacrés aux facteurs favorisant ou inhibant cet assemblage. Disons immédiatement que la plupart des poisons des MT empêchent, à des concentrations très faibles, la formation des MT à partir de tubuline. L'existence d'une concentration critique (fig. 1) suggère que des phénomènes de nucléation sont indispensables, précédant la formation des MT. En fait, on a montré la formation de structures annulaires, formées d'un nombre variable

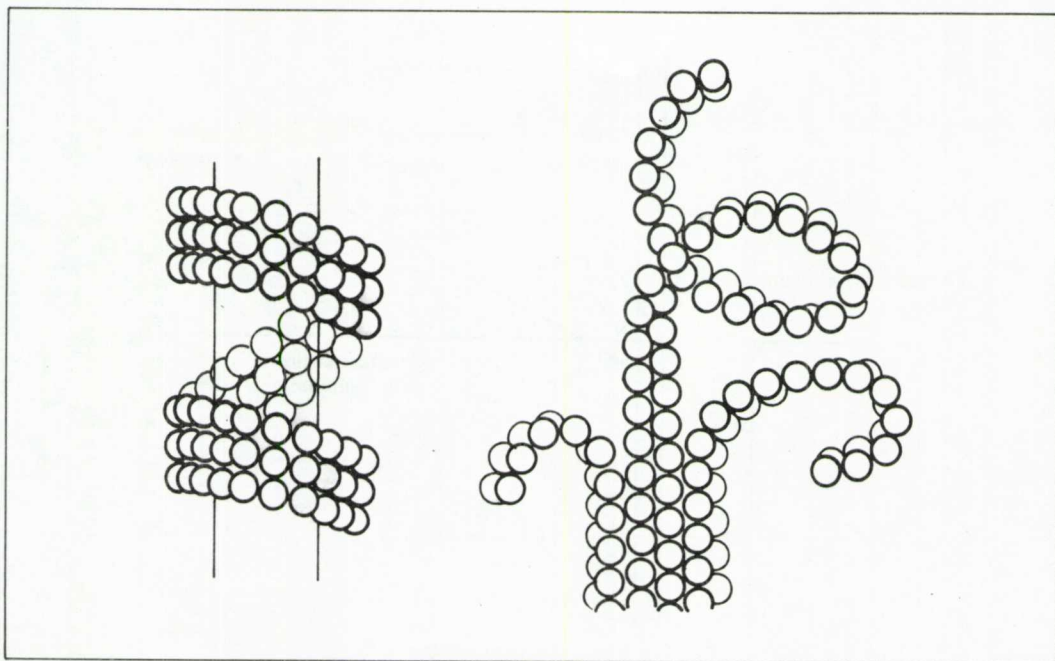


Fig. 2. Possibilités d'assemblage des molécules de tubuline. A droite: images en croise, indiquant la plus grande stabilité des liaisons longitudinales (formation de protofilaments). Des aspects analogues s'observent lors du désassemblage sous l'action de la vinblastine ou de la vincristine. A gauche: structure en hélice: des images analogues se rencontrent lors de la formation de macro-tubules. Ici, une hélice de protofilaments s'enroule autour d'un MT normal qui est ainsi "décoré".

de sous-unités de tubuline, ainsi que de courtes spirales. Cependant il est bien démontré que ces structures ne sont pas indispensables, et que l'assemblage peut se faire directement. Toutefois, de nombreux problèmes restent posés, que nous ne pouvons que résumer ici.

Il semble que les liaisons les plus solides, et celles qui sont formées les premières, sont longitudinales: il se forme ainsi des protofilaments constitués de dimères de tubulines α et β (fig. 2). Ces protofilaments pourraient peut-être constituer les anneaux observés dans certaines conditions. Ils se grouperaient ensuite parallèlement les uns aux autres, et se recourberaient ensuite pour se refermer en tubules de 13 protofilaments. Ce nombre est le plus fréquent, mais il convient de noter que des MT peuvent avoir, dans les conditions les

plus physiologiques, de 9 à 15 protofilaments. On trouvera dans les revues récentes de Kirshner (109), Raff (157), Timasheff et Grisham (202) des discussions détaillées de ces questions. Signalons aussi les importantes contributions de Weisenberg (212) et de Borisy et son groupe (Johnson et Borisy (103); Bergen et Borisy (16); Cote et Borisy (44)).

1.2. Les protéines associées aux MT (MAPs)

Lorsque de la tubuline purifiée s'assemble en MT, ceux-ci se présentent comme des structures tout à fait lisses, ce qui n'est pas le cas dans la cellule vivante, ou lorsque les tubulines sont associées à un groupe de protéines qui se purifient en même

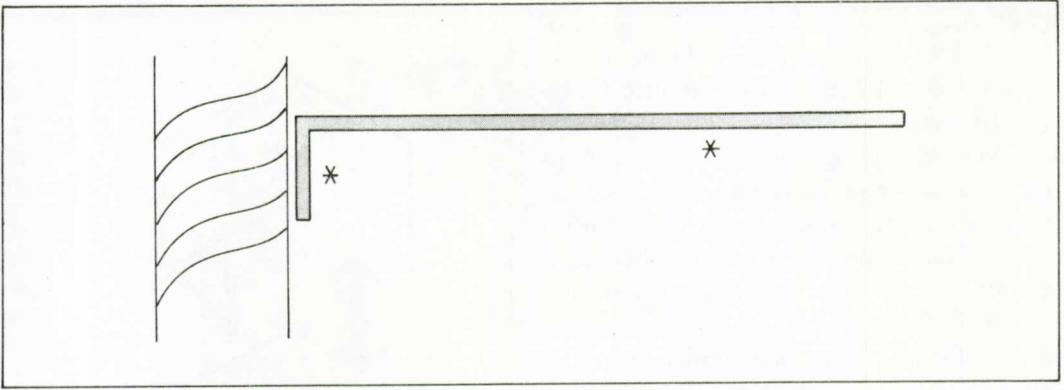


Fig. 3. Forme schématique de la molécule de MAP2 liée à un MT. Les astérisques indiquent les sites de phosphorylation (d'après Vallee, 1980, simplifié).

temps qu'elles, les "protéines associées aux MT" ou MAPs. Dans ce cas, les MT apparaissent hérissées de filaments flexueux, disposés périodiquement à leur surface, et pouvant unir les MT les uns aux autres ou lier les MT à d'autres structures cellulaires. Deux de ces protéines ont un poids moléculaire élevé, de plus de 200.000 daltons. La mieux connue à l'heure actuelle est MAP2. Celle-ci, d'après les recherches Sheterline (181) et Vallée *et al.* (206) se présente comme une molécule allongée, en L, dont la branche la plus petite est attachée à la paroi du MT (fig. 3). Cette protéine peut être phosphorylée par une protéine-kinase qui paraît lui être étroitement associée. On a pu mettre en évidence MAP2 dans des cellules, par immunofluorescence: sa répartition est en général semblable à celle des MT (Bulinski et Borisy (29)). Le rôle de MAP1 est moins bien connu. Alors que MAP2 joue un rôle dans l'assemblage des MT et leur confère une plus grande stabilité, et se retrouve dans des cellules très diverses, MAP1 ne paraît pas intervenir dans l'assemblage des MT; il pourrait toutefois jouer un rôle lors de la formation des anneaux au début de l'association des sous-unités de tubuline (Villasante *et al.* (207)).

Un autre facteur associé aux tubulines est nommé *tau* (Kirshner *et al.* (111)). C'est une protéine de forme allongée, d'un poids moléculaire d'environ 60.000 daltons, très résistante à la chaleur, et que l'électrophorèse sépare en quatre bandes rapprochées. On pense que le facteur *tau*, par sa forme, pourrait jouer un rôle dans la stabilité longitudinale des protofilaments. (Pennin-groth *et al.* (149)). En comparant *tau* purifiée à partir de la poule, du porc et de la souris, Cleveland *et al.* (38) ont montré qu'il s'agissait d'une protéine, qui, comme les tubulines, était demeurée très stable au cours de l'évolution. Le facteur *tau* paraît aussi intervenir dans l'assemblage des tubulines sous forme d'anneaux (Pennin-groth (148)). Par contre, dans certaines conditions, alors que MAP2 conduit à la formation de rubans et non de tubules, *tau* permet l'assemblage de MT (Sandoval et Weber (166)).

La complexité des relations entre les protéines de poids moléculaire élevé (en particulier les MAPs) et les MT a été montrée, par des techniques immunohistochimiques, dans le système nerveux. Alors que des anticorps antitubuline colorent tous les MT, seuls les MT des dendrites sont positifs

pour des anticorps dirigés contre les protéines lourdes associées (Matus *et al.* (135)). Cette différenciation montre l'intérêt des méthodes morphologiques d'étude des MT, et rejoint d'autres données montrant l'absence de MAPs au niveau de cellules gliales en culture (Izant et McIntosh (98)). D'autres protéines peuvent être, dans certaines structures, étroitement associées aux MT. Dans les cils, la *dynéine*, qui est une ATPase, forme des ponts entre les neuf doublets périphériques, et participe aux mouvements ciliaires. Cette protéine se fixe sur des MT isolés et fournit ainsi un des moyens d'identifier leur polarité (cf. Telzer et Haimo (196)). Plusieurs autres enzymes sont étroitement associées aux MT, tout au moins dans certains tissus: nous avons déjà mentionné la tubulinytrosine ligase et la phosphorylase cAMP-dépendante. Signalons aussi une diglycéride kinase, et une phosphoprotéine phosphatase (cf. Vallee *et al.* (206)). Enfin, des activités enzymatiques importantes sont en rapport avec les nucléotides de la guanosine fixés sur les MT: GTPase, GDPase, nucléoside diphosphate kinase (cf. Luduena (118)).

1.3. Rôle des guanosines nucléotides

Ces enzymes sont liées à la présence, dans toutes les tubulines, de molécules de GTP et de GDP. Il y a, pour chaque dimère un site où ces nucléotides sont facilement échangeables avec le milieu (site E) et un autre, non échangeable (site N). Nous pouvons passer sous silence ce dernier, où est fixée une molécule de GDP (peut-être parfois GTP), car on connaît que très mal sa fonction. Par contre, le site E, qui est localisé sur la tubuline β , fixe une molécule de GTP qui au moment de l'assemblage des MT est hydrolysée en GDP. On a pu montrer, preuve de la pola-

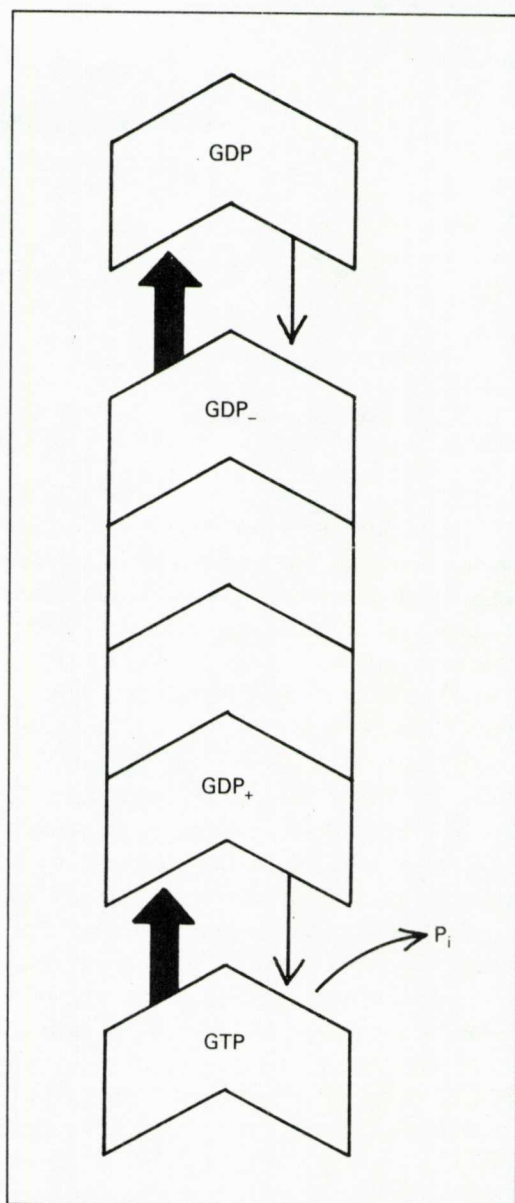


Fig. 4. Assemblage et désassemblage de la tubuline (simplifié, d'après Kirschner, 1980). La tubuline-GTP se fixe à l'extrémité +, le phosphate inorganique étant libéré. A l'extrémité -, se détachent des molécules de tubuline-GDP. Dans des conditions d'équilibre, en fonction des concentrations et des vitesses d'assemblage et de désassemblage, un état stable peut être prévu, avec conservation de la longueur du MT malgré le mouvement constant ("treadmilling") des molécules le long de ceux-ci.

rité des MT, que cette fixation de GDP se faisait à une extrémité du MT, celle qui est en croissance et qui appelée positive, et était libérée à l'autre extrémité, négative, où se désassemblaient les sous-unités de tubuline. L'utilisation de GTP marqué a permis ainsi de mettre en évidence le phénomène appelé en anglais "*treadmilling*", ou "courroie transporteuse", qui implique que dans des conditions d'équilibre, in vitro, les MT peuvent conserver la même longueur tout en s'allongeant à l'extrémité + et se raccourcissant à l'autre (fig. 4). Il est probable que ce phénomène se passe aussi in vivo, dans des circonstances particulières (par exemple les MT "libres", sans fixation à leur extrémité, comme dans les axones). Il pourrait jouer un rôle dans les mouvements associés aux MT (Kirshner (110)).

La tubuline ressemble, à ce point de vue, à un autre composé fibrillaire du cytoplasme, l'actine, dont l'assemblage implique l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Toutefois, les relations exactes entre assemblage et GTP sont encore mal comprises. En effet, des dérivés non hydrolysables des guanine nucléotides peuvent, in vitro, permettre la formation de MT. On trouvera des revues de ces problèmes dans les articles de Jacobs et Cavalier-Smith, en 1977, et dans le chapitre qui leur est consacré par Jacobs, dans le traité de Roberts et Hyams (162). On a récemment montré, ce qui complique encore l'interprétation du rôle du GTP qu'en présence de *taxol* (dont nous parlerons plus loin), les MT sont stabilisés bien que l'hydrolyse du GTP se poursuive (Hamel *et al* (79)). Toutefois, l'hydrolyse du GTP en GDP apparaît, dans des conditions physiologiques, comme indispensable à l'assemblage des MT, sans que l'on sache exactement à quel niveau l'énergie libérée est utilisée. L'ATP ne peut remplacer le GTP et au contraire,

peut inhiber l'assemblage (Margolis et Reuch (130)). Ces mêmes auteurs ont souligné que dans des extraits de cerveau (contenant de la tubuline et des MAPs) une déplétion en GTP entraîne un désassemblage rapide des MT. Comme on le voit, des données contradictoires sont relevées dans la littérature, ce qui tient aux diverses techniques utilisées: retenons pourtant les relations complexes entre l'assemblage (et sans doute la désassemblage) de MT et l'hydrolyse d'une molécule de nucléotide triphosphate par dimère de tubuline.

1.4. Rôle du calcium

Un autre facteur, qui pourrait être très important dans la cellule, est le *calcium*, en relation avec la protéine qu'est la *calmoduline*. Nous avons signalé qu'in vitro, les MT ne pouvaient se former qu'en l'absence presque complète de calcium. Des variations minimales du taux du calcium intracellulaire pourraient jouer un rôle dans le dynamisme de l'équilibre tubuline-MT (cf. Luduena (118)). Un excès d'ions Ca^{2+} entraîne rapidement, dans des modèles variés, la destruction (ou le désassemblage) des MT. Il semble que les sous-unités quittent les MT à leurs extrémités, comme dans le phénomène de "*treadmilling*" (Karr *et al* (106)). Une étude récente sur des cellules de singe, où le réseau de MT était mis en évidence par immunofluorescence après traitement par un détergent, indique qu'à des concentrations dépassant 1 à $4\mu\text{M}$, le Ca^{2+} désassemble les MT. Cet effet est en partie antagonisé par les MAPs, et inhibé par des agents qui se lient à la calmoduline (Schliwa *et al* (176)). De plus, le Ca^{2+} associé à la calmoduline peut activer une protéine-kinase, et exercerait ses effets sur les MT en modulant la phosphorylation de leurs constituants (Burke et De Lorenzo (30)). Comme nous le verrons

plus loin, l'observation (Welsh *et al* (215) et De Mey *et al* (53)) que de la calmoduline peut être mise en évidence dans les régions du fuseau mitotique où on a des raisons de croire que les MT se désassemblent, ajoute encore de l'importance aux relations entre Ca^{2+} et MT.

1.5. Les centres organisateurs de MT (MTOC)

Contrairement à ce qui se passe *in vitro*, dans des conditions artificielles, on constate que dans la cellule l'assemblage polarisé des MT débute souvent au niveau de "centres organisateurs" ou MTOC: corps denses péricentriolaires, kinétochores, corps basaux, plaques polaires, etc. (cf. Brinkley *et al* (25)). On a pu montrer que des chromosomes isolés, placés dans une solution

de tubuline dans des conditions appropriées, assemblaient des MT au niveau des kinétochores (Sloboda *et al* (184)). De même, des cellules traitées par des détergents et placées en présence de tubuline montrent l'assemblage de MT à partir de MT préexistants ou de structures péricentriolaires. Après destruction réversible des MT par des poisons du groupe des benzimidazoles (nocodazole), les MT se reforment à partir de ces structures (De Brabander *et al* (50)).

Ce type d'assemblage à partir de MTOC soulève le problème, très important en ce qui concerne la mitose et les mouvements associés aux MT, de la polarité de ces derniers. Comme nous l'avons vu, l'unité est le dimère, qui est lui-même polarisé. Les MT ont une extrémité + et une -, et leur assemblage se fait donc dans une seule di-

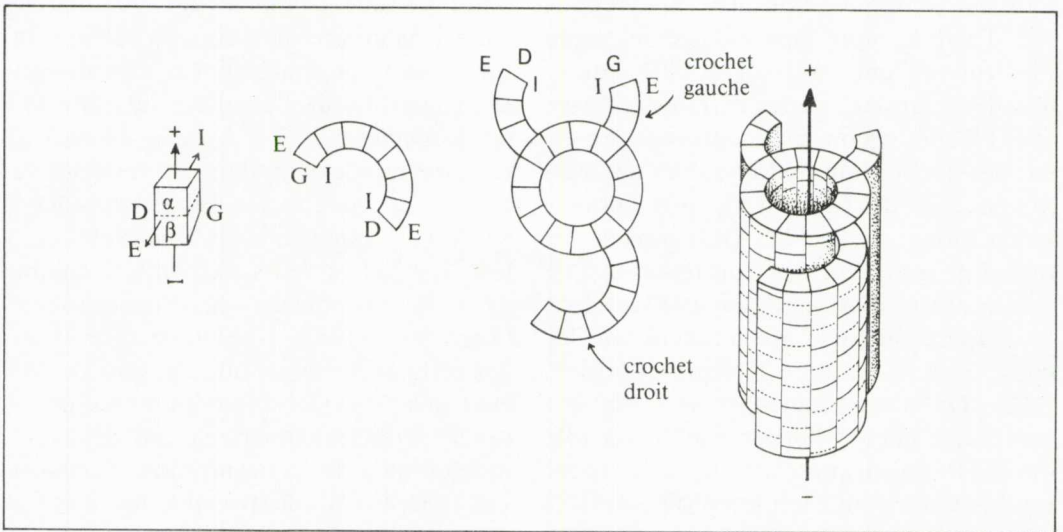


Fig. 5. Principe de la détermination de la polarité des MT par l'assemblage de molécules de tubuline dimère à leur surface (d'après McIntosh, 1980).

A gauche, le dimère de tubuline avec ses extrémités + et -, ses côtés droit (D) et gauche (G) et son orientation (E: extérieur; I: intérieur). Les schémas du centre montrent l'assemblage normal et la formation de "crochets" formés de lames de tubuline à la surface d'un MT normal, montrant la fixation préférentielle du côté G sur la surface E des dimères. L'image de droite montre que l'orientation des lames est fonction de la polarité du MT, les lames les plus étendues correspondant à la formation de crochets tournés vers la droite (face G liée à la face E). De petits crochets orientés de façon opposée sont beaucoup plus rares (D sur E).

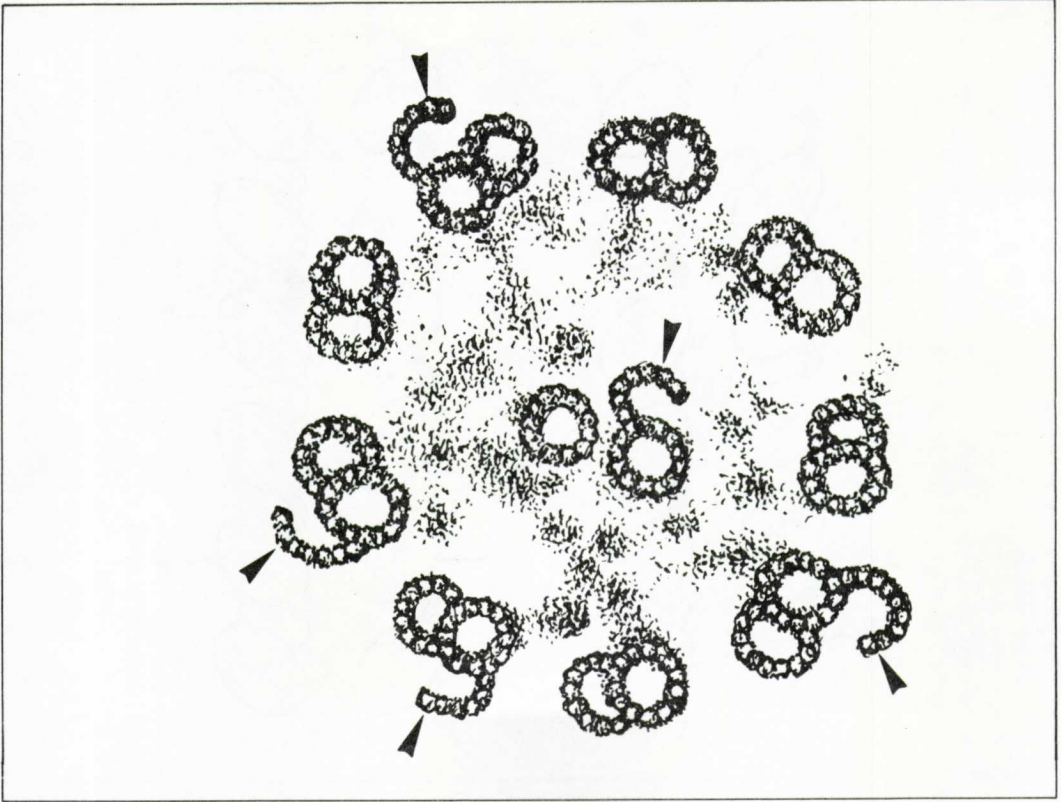


Fig. 6. Assemblage de lames de tubuline à la surface des doublets périphériques et des MT centraux d'un cil de *Tretrahymena* isolé traité par une solution de tubuline après destruction de la membrane externe. La coupe est orientée pour un observateur regardant vers le corps basal. Tous les crochets sont orientés vers la droite, indiquant que tous les MT ont la même polarité (schématique, d'après Euteneuer et McIntosh, 1981).

rection, d'autant plus qu'ils sont fixés sur un MTOC. On peut croire que l'extrémité + serait distale dans ce cas, l'autre attachée au point de départ, centriole ou corps basal. En ce qui concerne les doublets extérieurs des cils, il est bien montré, lors de la régénération ciliaire, que c'est ainsi que s'allongent les MT. Toutefois, il manquait une méthode morphologique pour connaître la polarité des MT. Une technique élégante a été mise au point par Heidemann et McIntosh (85) (cf. Heidemann (84); McIntosh *et al* (123); McIntosh (122)). Elle consiste à placer les cellules dans une solution de tubuline, dans des conditions favo-

rables à l'assemblage (fig. 5). Il se forme alors, à la surface des MT, des assemblages de dimères de tubuline sous forme de lames concaves, et la direction de celles-ci semble être directement en rapport avec la polarité des MT. Ce fait a été démontré tout d'abord pour les doublets ciliaires (dont la polarité était connue) (figure 6), ensuite pour les axonèmes des radiolaires (dont tous les MT, qui se régénèrent à partir de la base de ces structures, ont la même polarité), pour les axones (Burton et Paige (32)), dont tous les tubules sont polarisés dans le même sens, et enfin pour le fuseau mitotique. Nous y reviendrons plus

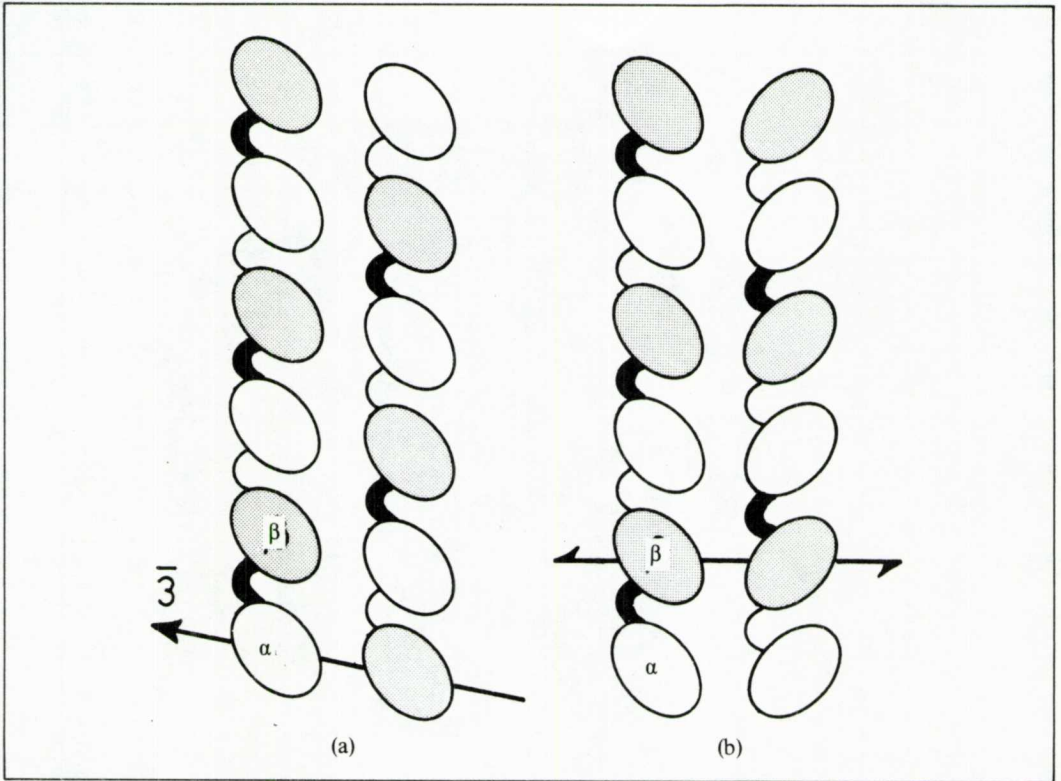


Fig. 7. Assemblage des sous-unités de tubuline α et β . A gauche (A) dans un microtubule normal, à droite (B) dans un feuillet de tubuline assemblée en présence de Zn^{2+} .
 a: les sous-unités sont groupées en dimères $\alpha\beta$, fortement liées les uns aux autres, plus lâchement liées aux dimères voisins du même protofilament (on ignore la position exacte de β par rapport à α). Les dimères sont disposées le long d'une hélice dont la pente est indiquée par la flèche.
 b: les feuilletts formés en présence de zinc sont plats, les sous-unités étant placées en tête-bêche (d'après Baker et Amos, 1978).

loin. Mentionnons enfin que la polarité des MT a pu aussi être mise en évidence en leur associant la dynéine: cette protéine ATPasique se dispose de façon régulière à la surface des MT, soulignant aussi leur caractère polarisé (Telzer et Haimo (196)): ces auteurs ont confirmé, en ce qui concerne les MT du fuseau mitotique, les observations de McIntosh (cf. Euteneuer *et al* (63)).

1.6. Autres formes d'assemblage des tubulines

Nous avons jusqu'ici parlé uniquement de l'assemblage des dimères de tubuline en

anneaux ou en MT. D'autres assemblages sont possibles, et ont permis de mieux comprendre les relations des sous-unités entre elles. Par exemple, en présence de zinc, il se forme, *in vitro*, des feuilletts plats de tubuline, où l'étude par diffraction montre que les dimères sont disposés en tête-bêche (Crépeau *et al* (45); Baker et Amos (12); Tamm *et al* (193); Amos et Baker (6)) (fig. 7).

In vitro, en présence de MAPs, il peut se former de larges bandes circulaires ("hoops"), formés par l'assemblage de nombreux protofilaments disposés côte à côte en spirale (Mandelkow *et al* (128));

ces structures ont aidé à mieux comprendre le mode d'assemblage des tubulines. La formation de feuilles ou de lames enroulées en spirale lâche a aussi été constatée *in vitro* dans des conditions expérimentales variées (cf. Matsumura et Hayashi (134); Hinkley (92)). Ces formes se rattachent à l'observation dans certaines conditions –action du froid ou de poisons des MT– de *macro*tubules, d'un diamètre de 30 à 50 nm (fig. 8). L'explication qui en a été donnée par Tilney et Porter (201), dans un étude du froid sur les MT des axopodes d'Héliozoaires, est acceptée par tous actuellement: il s'agit d'une dislocation de la paroi des MT dans laquelle les liaisons longitudinales sont maintenues, tandis que les liaisons transversales (latérales) sont relâchées, ce qui conduit à une disposition en hélice lâche des protofilaments. Cette altération est analogue à celle produite sous l'influence des alcaloïdes de la Pervenche (vinblastine, etc...).

Comme on le voit, l'assemblage des sous-unités de tubuline pour former des MT est un processus très complexe, dans lequel interviennent les diverses liaisons entre dimères, les conditions ioniques du milieu, le taux de calcium, la calmoduline, les MAPs, le GTP, et sans doute encore d'autres facteurs. Il est important de noter que l'on commence à peine à comprendre

la forme de la molécule de tubuline (cf. Ponstingl *et al* (152)), que l'on ne sait donc pas comment s'articulent entreelles les sous-unités constitutives des MT, et comment certains poisons inhibent spécifiquement cet assemblage. Il faut retenir aussi que dans la cellule vivante, et *in vitro*, les MT sont des structures dynamiques, capables de déplacer leurs sous-unités par le phénomène de "treadmilling", et associées à plusieurs protéines ayant des fonctions importantes (MAP2, *tau*, etc...). Il conviendrait aussi d'envisager les problèmes de la régulation de la synthèse de la tubuline (nous avons vu que plusieurs gènes, situés sur plusieurs chromosomes, y participent) (Cleveland et Kirshner (37)), mais ceci sortirait du cadre de cet exposé. Signalons toutefois qu'il existe un pool de tubulines dans la cellule, et, comme le montrera l'étude de la mitose, que les MT sont en équilibre dynamique avec les dimères de tubuline, ce qui permet une extrême plasticité du système microtubulaire, la tubuline libérée par la destruction des MT pouvant rapidement être réassemblée en nouveaux MT.

2. Les poisons des MT

La découverte des MT est étroitement liée à celle des agents qui bloquent les mi-

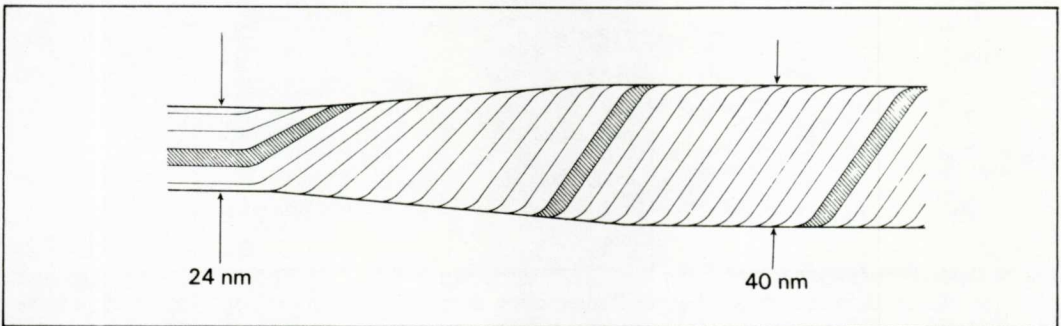


Fig. 8. Représentation schématique de la transition entre MT et *macro*T: on note la disposition en spires plus lâches des protofilaments de tubuline (après Susaki *et al.*, 1980).

toses en métaphase ("stathmocinèse") en détruisant les structures fusoriales. Parmi les agents chimiques, la colchicine (et la désacetyl-N-méthylcolchicine ou colcémide) est la plus largement utilisée, et de très nombreux auteurs ont utilisé cet alcaloïde comme poison spécifique des MT, ou ont étudié ses propriétés pharmacologiques ou thérapeutiques, dans des maladies humaines variées. Par ailleurs, il existe un nombre élevé de corps chimiques qui ont des effets semblables: les alcaloïdes de la pervenche, la podophyllotoxine et plusieurs de ses dérivés, la griséofulvine, les dérivés du benzimidazole, etc... Plusieurs de ces substances ont trouvé une application thérapeutique, en particulier dans la chimiothérapie des tumeurs. Par ailleurs, des agents physiques peuvent altérer les mitoses –et les MT– de façon analogue, et il est intéressant de comparer leur action à celle des agents chimiques. Nous considérerons surtout l'action du froid.

Rappelons que les premiers corps chimi-

ques qui montrèrent des images d'accumulation de mitoses bloquées chez la souris furent des arsenicaux, comme l'anhydride arsénieux et le cacodylate de Na (Piton (151)). Ces travaux de l'Ecole de Bruxelles furent oubliés pendant de longues années, et ce n'est qu'assez récemment que des chercheurs ont confirmé le rôle des groupes sulfhydryles dans l'assemblage des MT, en montrant par exemple l'action toxique du diamide sur les MT (Mellon et Rhebhun (136)). Le diamide, dont la formule est $(\text{CH}_3)_2\text{NCON} = \text{NCON} - (\text{CH}_3)_2$, se combine à deux groupes $-\text{SH}$ de la molécule de tubuline, inhibe les mitoses et empêche l'assemblage *in vitro* de la tubuline.

2.1. La colchicine

Lorsqu'il y a près de trente ans nous rédigeons une monographie consacrée à l'alcaloïde du Colchique d'automne (Eigsti et Dustin (62)) la plupart des travaux se rap-

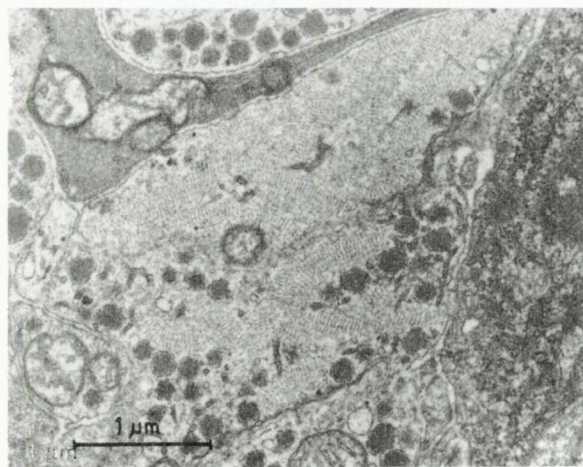


Fig. 9. Modifications des MT sous l'influence de la vincristine. Lobe postérieur de l'hypophyse d'un rat âgé de 13 jours, après 2 heures d'incubation en présence d'une solution de VCR. Un prolongement nerveux, reconnaissable à ses grains de neurosécrétion denses, est entièrement occupé par une accumulation de structures paracrystallines en échelles provenant de l'action de la VCR sur la tubuline. (Cf. Dustin, 1978, fig. 9.4).

portaient à l'action sur la mitose et aux applications pratiques d'une drogue capable d'augmenter l'index mitotique des tissus par l'accumulation des stathmocinèses, et de produire aisément des plantes polyploïdes ou hétérodiploïdes. Quelques rares travaux mentionnaient des modifications de la forme de cellules végétales traitées par la colchicine, sans que l'on en soupçonnât la cause; nous étions cependant persuadés qu'elle devait se fixer sur un constituant bien précis du fuseau.

Depuis la découverte des MT, la colchicine a été utilisée sur une très large échelle pour leur étude, puisqu'il est apparu rapidement que ses effets, tant sur la mitose que sur les cellules interphasiques, pouvaient s'expliquer par sa fixation sur la molécule de tubuline, plus précisément sur la tubuline α . Ceci pouvait s'étudier aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la colchicine empêchant l'assemblage des microtubules.

De nombreux auteurs, observant les effets analogues –sur les sécrétions, sur les mouvements cellulaires, etc.– de plusieurs poisons des MT, en ont conclu que les MT étaient impliqués dans ces divers processus. Il convient de dire dès maintenant qu'il faut être prudent dans ces conclusions: la colchicine et les autres poisons des MT ont des effets pharmacologiques indépendants de leur action antimicrotubulaire, surtout si l'on utilise des doses assez élevées. Par ailleurs, des MT résistants à la colchicine se rencontrent aussi, notamment chez les unicellulaires. Trop d'auteurs simplifient les faits en écrivant que la colchicine "détruit les MT".

En réalité, le mode d'action de cet alcaloïde demeure encore imparfaitement compris. Si l'on sait qu'il s'attache à la tubuline α (peut-être aussi dans certaines conditions à la tubuline β . Heusèle et Carlier (90)) on ne sait pas à quel groupement chimique de la chaîne polypeptidique il se

fixe –on a suggéré que ce serait au voisinage d'un des groupes –SH indispensables à l'assemblage des MT– ni pourquoi la colchicine-tubuline est devenue incapable de s'associer en MT. Si la majorité des auteurs conclut que la colchicine empêche essentiellement l'assemblage –les MT disparaissant car leur désassemblage physiologique se poursuit sans entrave– d'autres écrivent que la colchicine "détruit" les MT: d'autres agents tels que le froid, un taux trop élevé de Ca^{2+} peuvent en effet désassembler très rapidement les MT, mais il n'est pas établi qu'il en va de même de la colchicine (fig. 9).

Par ailleurs, on sait qu'il ne faut que de très faibles quantités de l'alcaloïde pour empêcher l'assemblage des MT: ceci a été expliqué par une fixation de molécules de tubuline-colchicine à l'extrémité + des MT: de ce fait, il suffirait de quelques molécules de colchicine pour bloquer de façon presque irréversible toute croissance des MT (Wilson *et al* (219); Margolis et Wilson (131)). La rapidité avec laquelle les MT seraient "détruits" dépendrait de leur vitesse de désassemblage à l'extrémité des MT. Cette conception explique bien que des MT faisant partie d'organites stables, sans renouvellement, comme les centrioles et les cils (en dehors de la mitose ou de régénération ciliaire après déciliation) ne soient pas affectés par les poisons des MT.

Bien des aspects des effets cytologiques de la colchicine demeurent encore mystérieux. Nous n'en citerons que deux. Dans les *leucémies lymphoïdes chroniques* humaines, les lymphocytes néoplasiques sont cent fois plus sensibles à l'action cytolytique (en dehors de la mitose) de la colchicine que les lymphocytes normaux. Cette sensibilité a été utilisée comme test de diagnostic. On en ignore tout à fait la signification (cf. Allen *et al* (5); Schrek et Stefan (178)).

TABLEAU 2. Stimulation de la synthèse du DNA par la colchicine

Auteurs	Matériel	Résultats
Teng <i>et al.</i> , 1977(198)	Fibroblastes d'embryons de poulet en culture	La colchicine, et la vinblastine, augmentent la stimulation mitotique produite par l'insuline.
Davidson, 1979 (48)	<i>Vicia fava</i>	L'augmentation de l'index mitotique (de 8,6 à 27,3 en 3 h.) est inhibée par le 5-aminouracile. La colchicine stimule les cellules en G ₁ et en S.
Suthanthiran <i>et al.</i> , 1980 (192)	Cultures mixtes de lymphocytes humains allogéniques	Augmentation de l'incorporation de ³ H-thymidine après action brève de la colchicine (10 ⁻⁶ M). Augmentation de la formation de cellules cytotoxiques
Chou <i>et al.</i> , 1981 (35)	Cellules 3T3 de souris Swiss en culture	La colchicine, la vinblastine et les nocodazole induisent une synthèse de DNA dans des cultures confluentes. "Activation" des cellules par désassemblage des MT?
Crossin & Carney, 1981 (47)	Fibroblastes en culture	La colchicine (10 ⁻⁷) double la synthèse de DNA. Augmentation de l'incorporation de ³ H-thymidine. Le nombre de cellules est doublé en deux heures par la colcémide (10 ⁻⁶ M)
Otto <i>et al.</i> , 1981 (145)	Cellules 3T3 en culture	Action synergique de la colchicine (10 ⁻⁶ M) et de facteurs de croissance sur la synthèse du DNA

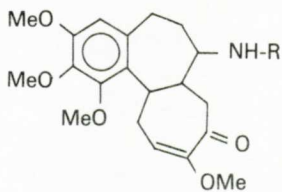
Une autre propriété, étudiée ces dernières années, fait rebondir un problème que l'on croyait résolu. Dans les premières publications sur les effets cellulaires de la colchicine, l'accumulation spectaculaire des mitoses dans les zones germinatives avait conduit Albert Dustin à la conclusion que le blocage mitotique était précédé d'une réelle *stimulation* des mitoses (cf. A. Dustin (56a)). Des recherches quantitatives plus précises avaient toutefois montré que

l'accumulation des mitoses pouvait s'expliquer par leur arrêt par absence de fuseau, et qu'il ne fallait pas envisager une stimulation mitotique, la colchicine apparaissant comme un poison spécifique des MT sans autre action sur le cycle mitotique. Or, plusieurs travaux modernes indiquent la possibilité d'une stimulation de la synthèse de DNA sous l'influence de la colchicine. Le tableau 2 résume les données acquises à ce sujet. S'agit-il d'une action di-

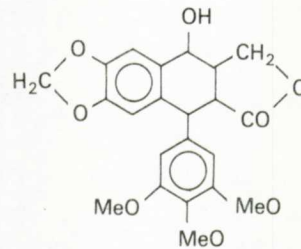
recte de la colchicine? Une autre hypothèse doit être présente à l'esprit: il y a des indications que l'augmentation du taux de tubuline libre dans une cellule stimule son entrée en mitose (Suthanthrian *et al* (192); Crossin et Carney (46)). On a aussi suggéré que les modifications des MT rendent plus accessibles certains récepteurs de surface pour des agents stimulant la mitose (Teng *et al* (198)).

Un autre effet de la colchicine –qu'elle partage avec d'autres poisons des MT– est

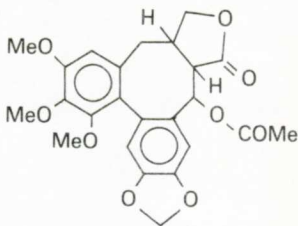
de modifier de façon spectaculaire les *microfilaments intermédiaires* (IMF), de ± 10 nm de diamètre, qui sont présents dans presque toutes les cellules. On constate en effet, après plusieurs heures d'action de la colchicine, que le cytoplasme contient des faisceaux denses de ces IMF, qui sont un des constituants normaux du cytosquelette (cf. plus loin). Ce phénomène, qui avait été décrit en 1967 par Wisniewski *et al* (220) dans les neurones de la corne antérieure de la moëlle du lapin après injection intrara-



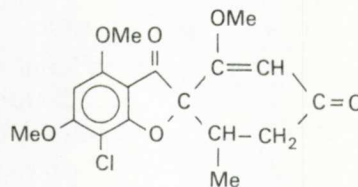
R = CO-CH₃ COLCHICINE
R = CH₃ COLCÉMIDE



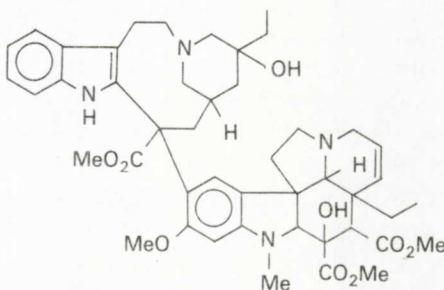
PODOPHYLLOTOXINE



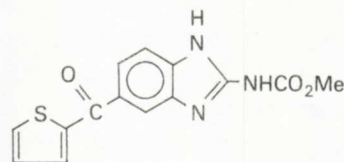
STEGANACINE



GRISÉOFULVINE



VINBLASTINE



NOCODAZOLE

Fig. 10. Formules chimiques des principaux poisons des microtubules.

chidienne de colchicine, a été précisé par les travaux plus récents de Franke *et al* (69) et Osborn *et al* (144). Ceux-ci ont montré que parmi les divers types de IMF, ce sont ceux formés de *vimentine* —une protéine surtout rencontrée dans les cellules conjonctives— qui participent à ce processus. Il s'agit non seulement d'une modification topographique des MF du cytosquelette, mais d'une augmentation de la synthèse des IMF. Ainsi, tout en diminuant le nombre des MT, la colchicine modifie profondément le cytosquelette, et certains effets qui auraient pu être attribués à l'atteinte des MT sont peut-être la conséquence de ces modifications.

2.2. Les alcaloïdes de la pervenche (*Catharanthus roseus* L.)

Les principaux sont la vinblastine (VLB) et la vincristine (VCR). Ils ont trouvé de nombreuses applications en chimiothérapie du cancer. Leur action sur les MT est comparable à celle de la colchicine, en ce qui concerne le blocage métaphasique des mitoses et les altérations de la forme et des mouvements cellulaires. Cependant, ils se fixent sur les tubulines (α et β) en des sites différents de ceux de la colchicine, et conduisent souvent à la formation dans les cellules de structures paracrystallines (fig. 10). Celles-ci qui sont constituées de tubuline (elles ont pu être isolées et utilisées comme source de tubuline pure; Bryan (26)), se forment par suite d'une transformation des MT dans laquelle les liaisons latérales entre protofilaments sont altérées, conduisant à des spires lâches qui à certains points de vue sont comparables aux macroT. (Himes *et al* (91); Starling (188)). VLB et VCR ont par ailleurs des actions pharmacodynamiques indépendantes des MT, actions qui jouent un rôle dans leur utilisation en médecine et en chimiothérapie du cancer.

2.3. Les dérivés de la résine de *Podophyllum*

Le principal est la podophyllotoxine, dont la formule chimique ressemble un peu à celle de la colchicine. Elle s'attache au même site que ce dernier alcaloïde sur la molécule de tubuline α , entrant ainsi en compétition avec la colchicine (Barnes et Roberson (14)). La podophyllotoxine a été utilisée pour étudier le phénomène de "treadmilling": elle se fixe à l'extrémité + des MT. Il semble que ce soit le composé tubuline-podophyllotoxine qui bloque l'assemblage (Karr et Purich (107)).

Signalons qu'une autre drogue d'origine végétale, la *stéganacine* (extraite de *Steganotaenia araliacea*) se fixe au même site que la podophyllotoxine. De nombreux analogues chimiques de la stéganacine ont été testés pour leur action inhibitrice sur l'assemblage des MT (Zavala *et al* (225)): ces molécules, comme la colchicine et la podophyllotoxine, possèdent un anneau aromatique avec trois groupements méthoxy.

2.4. Les dérivés du benzimidazole

L'intérêt de ce groupe de poisons (outre leur utilisation comme antifongiques, antivermineux et en chimiothérapie cancéreuse) est leur action beaucoup plus brève et plus rapidement réversible sur les MT. Les plus utilisés sont le *nocodazole*, antitumoral, le *carbendazime*, surtout antifongique, le *mébendazole*, antivermineux, leur spécificité s'explique par une action élective sur les MT des organismes sensibles (cf. Friedman et Platzner (73); Ireland *et al.* (97)). Leur action réversible, jointe au fait qu'ils amènent une destruction totale de tout le squelette microtubulaire des cellules (sauf les MT des centrioles) a permis d'étudier de façon précise la régénération des MT, après lavage des cellules (De Brabander *et al.* (51)).

2.5. Autres poisons chimiques

Une longue liste de substances plus ou moins actives contre les MT pourrait être donnée. Mentionnons en passant quelques molécules d'un intérêt plus particulier. La *griséofulvine*, utilisée en thérapeutique humaine comme agent antifongique, agirait par un mécanisme différent de la colchicine, peut-être en se combinant aux MAPs (Roobol *et al* (164)). Toutefois, d'autres ont conclu qu'elle se fixait bien sur la tubuline elle-même (Wehland *et al* (210)), dont elle peut entraîner un assemblage atypique, fibrillaire, même à basse température. Une des particularités intéressantes de ce corps est de produire, en administration chronique, chez l'animal, des lésions des hépatocytes identiques aux corps de Mallory connus en pathologie humaine (cirrhoses alcooliques), corps qui sont formés d'un amas de IMF (cf. Borenfreund *et al* (21)), constitués de prékératine (Kimoff et Huang (108)), peut-être associée à d'autres protéines. La *griséofulvine*, chez l'algue *Physarum*, fait apparaître une variété nouvelle de macroT., qui ont été nommée "mégatubules", et dont le diamètre atteint de 70 à 90 nm (Hebert *et al* (83)).

Mentionnons encore la *maytansine*, un macrolide, dont la fixation sur la tubuline se ferait au même site que la vinblastine (Lin *et al* (115)), l'*halothane*, un anesthésique général, qui, peut faire apparaître des macroT. chez l'écrevisse (Hinkley et Samson (93)), et de nombreuses autres molécules d'origine naturelle (antibiotiques) ou de synthèse, comme les dérivés trialkylés de l'étain (Tan *et al* (194)).

2.6. Action du froid

On sait que les MT peuvent être détruits par les pressions hydrostatiques élevées,

qui ont surtout été étudiées dans la mitose, et par le froid (entre 0° et 4° C). Ce dernier effet est intéressant à comparer à l'action des poisons chimiques, car ici il s'agit bien d'un désassemblage rapide, une véritable dissolution des MT en leurs tubulines constitutives, qui peut se faire en quelques minutes. Toutefois, tous les MT ne sont pas également sensibles à l'abaissement de la température (ni sans doute aux fortes pressions hydrostatiques: n'oublions pas que de nombreux animaux vivent sans problèmes dans des mers froides et parfois à très grandes profondeurs). Il existe un groupe de MT résistants au froid: ceux des doublets ciliaires, souligné dès 1967 par Behnke et Forer (15). Cette stabilité dépend d'une part de l'association de ces MT avec d'autres protéines, de l'autre de l'absence de renouvellement de ces MT. Nous mentionnerons plus loin d'autres MT résistants.

Le froid permet de reproduire tous les effets des poisons décrits plus haut: blocage des mitoses, arrêt des mouvements associés aux MT (comme le flux axonal), modifications de la forme des cellules, inhibition de l'assemblage des tubulines *in vitro*. Notons que la température optimale d'assemblage peut-être plus basse dans le cas de tubulines provenant d'animaux à sang froid (cf. Maccioni et Mellado (125)). Des modifications des MT souvent observées à basse température sont la formation de macrotubules (cf. Cachon et Cachon (34); Susaki *et al* (191)) ou de MT incomplets en forme de C (Hardham et Gunning (81)).

Le froid peut détruire très rapidement les MT, bien qu'il s'agisse d'un phénomène réversible, le réassemblage étant beaucoup plus lent. En voici quelques exemples: *in vitro*, une suspension de MT assemblés à partir de la tubuline de doublets ciliaires (pourtant résistants au froid) est désassemblée en 5 min à 0° C (Farrell et

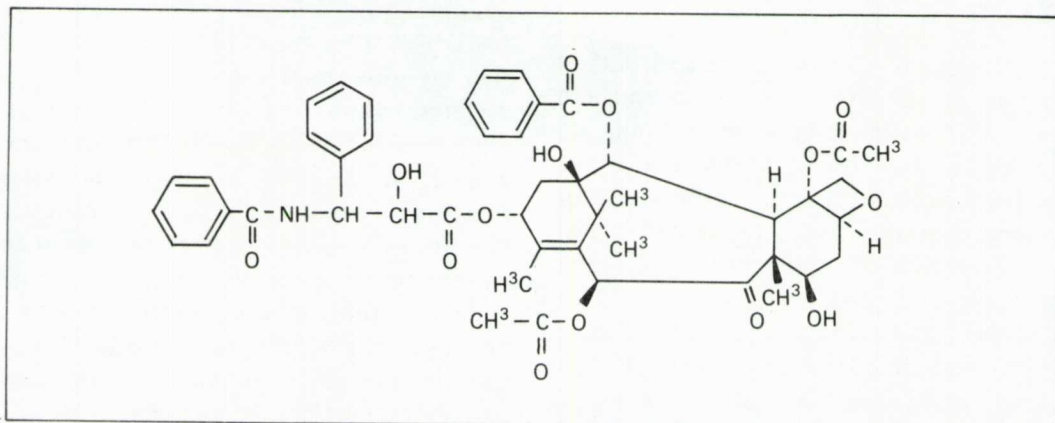


Fig. 11. Formule du taxol.

Wilson (64)); des MT assemblés *in vitro* en présence d'un analogue du GTP et résistants au Ca^{2+} sont détruits en quelques minutes (Macneal et Purich (126)); le réseau dense de MT des mélanophores (cf. plus loin) observé par immunohistochimie est détruit en quelques minutes (Schliwa *et al.* (174)); une température de 13° suffit déjà à réduire de 30 % les MT axonaux chez le lapin (Brimijoin *et al.* (23)); chez l'Héliozoaire *Sticholonche*, en une heure, il se forme d'abord des macrotubules puis des structures fibrillaires paraissant provenir des MT des axonèmes (Cachon et Cachon (34)), etc... Bien d'autres exemples de la fragilité des MT vis-à-vis du froid pourraient être cités. Un dernier est important, car les MT des nerfs sont en général résistants à la plupart des poisons des MT: chez le crapaud (*Bufo arenarum*) après une heure à 4° , plus de 95 % des MT du nerf sciatique ne sont plus visibles. Ce phénomène est réversible et en une heure à une température normale (20°) tous les MT sont à nouveau assemblés (Piezzi et Cavicchia (150)).

Comme on le voit, le froid a une action plus rapide que la plupart des poisons chimiques. Par ailleurs, il existe dans diverses cellules, une fraction de MT résistante au

froid. Brinkley et Cartwright (24) ont montré que les MT du fuseau mitotique des cellules du rat-kangourou étaient inégalement affectés par le froid, les MT attachés aux kinétochores et ceux du corps télophasique étant plus résistants. Cette résistance dépendrait de l'environnement plutôt que des MT eux-mêmes. Dans les fibroblastes d'embryons de souris, on trouve aussi un nombre élevé de MT résistants à 0°C . Ces MT sont toutefois détruits par un excès de Ca^{2+} et ne sont plus apparents dans les cellules traitées par la colchicine ou la vinblastine (Bershadsky *et al.* (17)). Des MT assemblés *in vitro* à partir d'extraits de cerveau non purifiés comprennent une fraction qui résiste à 0° : Webb et Wilson (209) qui ont mis ce fait en évidence pensent que la stabilité est conférée par un facteur particulier qui contribuerait à la régulation de l'assemblage des MT. Ce facteur se séparerait des tubulines sous l'effet du Ca^{2+} . Ces MT résistants ont été purifiés et sont résistants à la podophyllostoxine. Ils ne sont détruits par des faibles concentrations de Ca^{2+} qu'en présence de calmoduline, confirmant l'importance de ce dernier facteur dans la régulation du désassemblage physiologique des MT (par exemple dans la mitose) (Job *et al.* (102)).

Voyons maintenant les effets d'une substance capable de conférer aux MT une résistance au froid, le taxol.

2.7. Le taxol: une "anticolchicine"

La découverte d'une substance d'origine végétale empêchant la croissance mitotique en rendant les MT anormalement stables a été faite dans le cadre de recherches sur la chimiothérapie du cancer, par Schiff *et al.* (168). Le taxol, dont voici la formule (fig. 11) agit d'une façon contraire à tous les poisons étudiés plus haut, puisqu'il rend non seulement les MT trop stables, mais de plus stimule leur assemblage à partir du pool de tubuline présent dans la plupart des cellules. Son étude, qui commence à peine, promet de nous apporter des données importantes sur les mécanismes régulateurs de l'assemblage des MT (cf. Schiff et Horvitz (169)).

Quelques propriétés du taxol peuvent être mentionnées ici. In vitro, il ralentit le renouvellement des MT par "treadmilling" (Thompson *et al.* (199)) et permet l'assemblage de MT même à 0° C (Thompson *et al.* (200)). Dans les cellules au repos, le taxol augmente la densité du réseau de MT, et peut conduire à la formation de nombreux petits groupes de MT anormalement courts (Herman et Albertini (88)): ces auteurs considèrent que l'assemblage se fait alors aux deux extrémités (+ et -) des MT. Une observation intéressante en rapport avec les relations entre MT et mitose, est que le taxol, en stabilisant les MT, bloque l'effet de la colchicine sur la synthèse du DNA (cf. plus haut) (Crossin et Carney (46)).

Le taxol introduit donc une nouvelle approche de l'étude des MT. Mentionnons qu'il existe au moins une substance qui physiologiquement favorise l'assemblage des MT, c'est le "nerve growth factor" (NGF) (cf. Yamada et Wessells (224)). Il

semble aussi qu'un agent utilisé en chimiothérapie anticancéreuse, la néocarzinostatine, un antibiotique agissant sur le DNA, augmente la densité du réseau microtubulaire de cellules en culture (Satake *et al.* (167)).

3. Microtubules, cytosquelette et forme

Les recherches modernes indiquent que le cytoplasme fondamental a une structure complexe, traversée par des protéines fibrillaires formant le cytosquelette (fig. 12). L'utilisation de la microscopie à haut voltage a montré que dans les meilleurs conditions de fixation, en plus de ces diverses fibrilles, le cytoplasme aurait une structure spongieuse, formée de *microtrabécules* (Wolosewick et Porter (223)). Les fibrilles qui constituent le cytosquelette appartiennent à trois classes, en fonction de leurs dimensions: nous connaissons déjà les MT (25 nm) et les microfilaments intermédiaires (IMF) d'environ 10 nm. Des protéines du groupe de l'actine sont présentes dans la plupart des cellules sous la forme de MF d'environ 5 nm de diamètre, et plus récemment Schliwa et Van Blerkom (1981) ont démontré par la stéréomicroscopie électronique, l'existence d'une nouvelle classe de filaments de 2 à 3 nm de diamètre.

Il convient d'ajouter à cette liste fort incomplète, car de nouvelles protéines de structure sont isolées chaque année, les protéines associées aux MT, qu'il s'agisse de protéines de poids moléculaire élevé non encore identifiés chimiquement (HMW protéines), les deux types de MAPs, la protéine *tau* qui paraît présente dans de nombreux types de cellules (Duerr *et al.* (54)) et les nombreuses protéines associées aux MT dans des structures complexes comme les centrioles, les corps basaux et les cils.

Les MT jouent, dans le maintien de la forme des cellules, ou de certains organites complexes comme les paniers cytopharyngiens de certains unicellulaires, un rôle de premier plan. Toutefois, nous savons combien ils sont labiles même dans des conditions physiologiques: le cytosquelette microtubulaire disparaît presque totalement pendant la mitose. La forme des cellules doit donc être maintenue par d'autres éléments. De plus, les MT, isolés, sont des structures rectilignes, alors que dans diverses cellules ils ont une forme courbe qui ne peut s'expliquer que par l'existence de liaisons latérales. Rappelons enfin que nous avons mentionné plus haut des modifications spectaculaires des IMF de 10 nm lorsque les MT avaient été désassemblés sous l'effet de divers poisons.

Nous rappellerons tout d'abord le rôle et la nature des différentes variétés de MF, pour décrire ensuite le rôle des MT et des autres constituants cytosquelettiques dans la forme de quelques types cellulaires: érythrocytes, spermatozoïdes, cellules végétales, unicellulaires.

3.1. L'actine et les IMF

L'actine est présente dans la plupart des cellules, sous la forme de microfilaments grêles, non ramifiés, de 5 nm. La mise en évidence de leur nature est facilitée par le fait que la *méromyosine* lourde se fixe électivement à la surface de ces filaments (dans des cellules auparavant traitées par des détergents pour permettre la pénétration de cette molécule). Il se forme ainsi

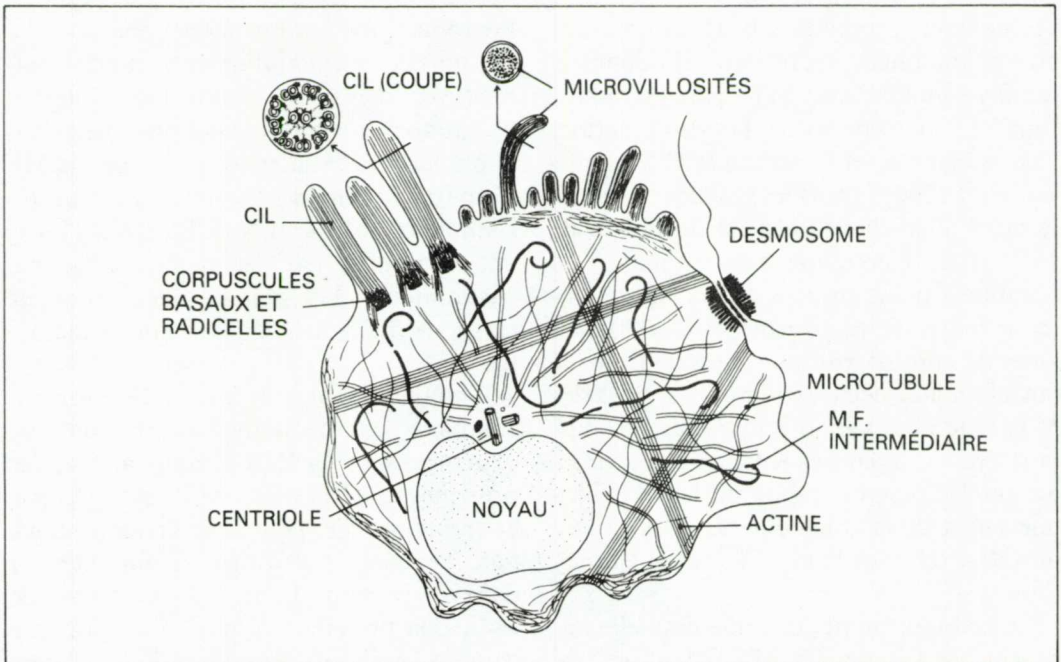


Fig. 12. Représentation schématique des principaux éléments fibrillaires du cytosquelette. Les fibres d'actine forment d'une part un feutrage sous la membrane cellulaire, de l'autre des faisceaux linéaires traversant toute la cellule. Les MT (avec leurs protéines associées) s'étendent à partir du centre cellulaire, tandis que les IMF (cytokératine ou vimentine) ont un trajet plus flexueux. D'autres protéines fibrillaires se rencontrent dans les microvillosités, les cils, et les desmosomes.

des images caractéristiques en chevrons, les molécules de méromyosine "décorant" la surface des MF d'actine. Ces derniers sont souvent groupés sous forme de trousseaux, s'étendant d'un côté à l'autre de la cellule de façon linéaire, ou sont accumulés sous la membrane cytoplasmique. Leur mise en évidence par des anticorps spécifiques est aisée. Cependant, si l'intervention de l'actine dans les mouvements cellulaires est évidente (cf. plus bas) il n'est pas établi que tous les mouvements soient liés à l'actine (et aux protéines de type musculaire associées: myosine, actinine, etc...): c'est notamment le cas de la mitose.

Le rôle des IMF est plus important pour nous, car ces fibrilles sont souvent étroitement associées aux MT et comme nous l'avons vu peuvent augmenter en nombre lorsque les MT sont désassemblés. L'utilisation des méthodes immunohistochimiques a permis de montrer que le groupe des IMF comprenait plusieurs protéines différentes (cf. Franke *et al.* (68, 69)). Dans les cellules épithéliales, les IMF se colorent par des anticorps dirigés contre la kératine, et sont constitués de *cytokératine* (ou prékératine). Dans les cellules conjonctives par contre, des IMF morphologiquement identiques sont formés d'une autre protéine, la *vimentine* (Franke *et al.* (71); Osborn *et al.* (144)). Il existe toutefois des cellules épithéliales qui contiennent à la fois de la prékératine et de la vimentine (Franke *et al.* (71); Osborn *et al.* (144)). Une situation analogue peut se rencontrer dans des fibres musculaires où la vimentine peut exister à côté d'une protéine fibrillaire spécifiquement musculaire, formant des IMF, la *desmine*. Rappelons que les paquets de fibrilles observées après destruction des MT sont surtout formés de vimentine (cf. plus haut). D'autres types de IMF sont rencontrés dans le système nerveux: les *neurofilaments* sont propres aux

neurones. Ils sont constitués par trois polypeptides de poids moléculaire différent (73.000; 145.000 et 195.000) contre lesquels on peut former des anticorps spécifiques. Ceux-ci se fixent à la surface de neurofilaments isolés, la polypeptide le plus lourd formant des images en hélice rappelant un peu la disposition de MAP2 à la surface des MT (cf. Willard et Simon (218)). D'un autre côté, les cellules gliales contiennent des *gliofilaments* dont la nature chimique et les propriétés immunologiques diffèrent de toutes les protéines fibrillaires mentionnées jusqu'ici.

Il ne fait pas de doute que le nombre de protéines du cytosquelette soit plus grand encore, bien que certaines d'entre elles, comme les tubulines, apparaissent identiques dans des espèces très différents, indiquant qu'elles ont été conservées pendant de longues périodes de l'Evolution. L'utilisation de l'immunohistochimie a permis de grands progrès dans ce domaine. Rappelons enfin l'intérêt de la *cytochalasine*, poison d'origine végétale, qui détruit de façon assez élective les MF d'actine. Par contre, on ne connaît aucun poison spécifique des MT intermédiaires.

3.2. Relations entre MFI et MT

Les modifications des IMF après destruction des MT par la colchicine ou d'autres poisons indiquent l'existence de relations étroites. Toutefois, elles demeurent encore mal comprises. Des études en microscopie électronique à haut voltage montrent que des contacts existent entre les deux éléments du cytosquelette, et que MT et IMF peuvent être reliés par des filaments ténus, qui sont probablement des MAPs (cf. Schliwa et van Blerkom (175)). Des liaisons analogues sont fréquemment rencontrées dans certaines structures complexes reliant les MT les uns aux autres.

Une observation importante a été faite par Runge *et al.* (1965): il ont isolé de préparations de tubuline de cerveau bovin une protéine d'un poids moléculaire de 68.000 qui d'une part semble favoriser l'assemblage des MT, et de l'autre se retrouve —par des méthodes immunologiques— dans les neurofilaments. Ils ont proposé de nommer cette protéine nouvelle "tubulin assembly protein" (TAP) à la suite de Lockwood (1967) qui a le premier isolé cette molécule dans des fractions de tubuline contenant le facteur *tau*. Rappelons aussi l'étroite association des MT avec les IMF formés de desmine dans le gésier du poulet (Geigèr et Singer (1976)). Nous verrons plus loin comment se comportent les microfilaments —actine, cytokératine, vimentine— pendant la mitose, lorsque le squelette microtubulaire de la cellule disparaît pour être remplacé par le fuseau.

3.3. *Quelques exemples de forme liée à la présence des MT*

Nous ne pouvons donner ici que quelques indications que les MT interviennent dans le déterminisme de la forme de cellules très diverses.

a. *Les érythrocytes et le faisceau marginal*

Alors que chez les Mammifères, les MT qui sont présents dans les premiers stades de l'érythropoïèse, disparaissent complètement dans les hématies adultes, les globules rouges elliptiques des autres groupes de Vertébrés ont à la périphérie de leur cytoplasme un faisceau de MT (*), qui avait été décrit dès le siècle dernier (cf. Dustin (1978)). Nous avons souligné plus haut que, les MT isolés étant rectilignes, une structure annulaire formée de MT implique l'existence de liaisons latérales entre ces organites. Sloboda et Dickerson (1966) qui ont

étudié cette bande marginale chez des Oiseaux et des Amphibiens, ont montré en effet qu'une protéine se colorant par des anticorps dirigés contre MAP2 était présente dans cette structure. Ils estiment qu'elle établit des liaisons transversales entre les MT, conférant sa stabilité à la bande, qui peut être aisément isolée des érythrocytes (Cohen (1978)). Elle peut se déformer en 8, ce qui suggère fortement que les anneaux de Cabot observés dans les hématies humaines au cours d'anémies pourraient être d'une nature analogue (une autre hypothèse qui a notre préférence serait que ces anneaux proviendraient du corps télophasique de la dernière mitose des érythroblastes; cf. Dustin (1978)).

Il est remarquable de constater qu'une structure aussi spécialisée se retrouve chez des Invertébrés, par exemple dans les globules rouges des vers siponculaires, les amibocytes de *Limulus*, les célocytes du homard et du crabe (Cohen et Nemhauser (1978)). Ces auteurs ont signalé que chez les Mollusques (contrairement à ce que l'on sait des Vertébrés) cet anneau de MT est en rapport avec deux centrioles qui agissent comme MTOC (Cohen et Nemhauser (1978)). Ces cellules ont aussi une forme elliptique qui paraît soutenue par le faisceau de MT.

b. *Les plaquettes sanguines*

Ces cellules spécialisées, sans noyau, ont une forme discoidale, avec un groupe périphérique de MT. La destruction de ceux-

(*) Une exception seraient les globules rouges (anulés) elliptiques des Camélidés, bien que l'opinion de Barclay (1966) ait été contredite par les observations de Goniakowska-Witalinska et Witalinska (1976), pour lesquels les MT disparaissent, comme, chez les autres Mammifères, lors de la maturation finale des globules. Pour Cohen (1978) les hématies elliptiques avec bande marginale seraient des réticulocytes. Ceci indiquerait que la forme elliptique persiste après disparition des MT (cf. Cohen et Terwilliger, 1979).

ci par le froid (0° C) entraîne, lorsque les plaquettes sont réchauffées, des modifications de forme qui démontrent bien le rôle des MT. En effet, il peut se reformer des plaquettes de forme normale, mais parfois les MT reformés deviennent parallèles les uns aux autres, conférant à la cellule une forme allongée et elliptique (Behnke (15a)). Il est remarquable de noter que les thrombocytes des Oiseaux, qui sont des cellules nucléées, possèdent de même un groupe périphérique de MT (Morgenstern et Janzarik (138)). Une diminution rapide et réversible du taux de tubuline assemblée en MT dans les plaquettes accompagne leur agrégation par des agents tels que la thrombine ou l'adrénaline, montrant un équilibre dynamique entre tubuline et MT (Steiner et Ikeda (190)).

Un problème qui est posé par ces structures marginales est de savoir s'il y a plusieurs MT côté à côté ou s'il n'y a qu'un seul MT, enroulé plusieurs fois: cette question a été abordée par Nachmias (140) qui a examiné *in toto*, en microscopie électronique, des plaquettes plus ou moins lysées. Il n'a observé qu'une seule extrémité de MT au niveau de la bande marginale, et conclut qu'il est probable qu'elle soit formée par l'enroulement d'un seul MT. Ce travail montre aussi une étroite association des MT avec divers microfilaments (actine, profiline).

c. Les spermatozoïdes

Il n'est pas question d'envisager les innombrables problèmes posés par le rôle des MT dans la spermatogénèse: des variantes considérables ont été décrites. En effet, non seulement les MT des structures flagellaires peuvent montrer des dispositions fort diverses, mais par ailleurs, les MT paraissent jouer un rôle dans la déformation du noyau lors des derniers stades de la spermatogénèse. Il se forme à ce mo-

ment, autour du noyau, une "manchette" de microtubules, peut-être enroulés en spirale d'après McIntosh et Porter (124).

De nombreux travaux ont été consacrés à cette structure qui joue certainement un rôle dans la forme de la cellule, mais qui peut être absente dans d'autres spermatogénèses et n'est donc pas indispensable à l'aplatissement du noyau (Bachetti (10)). La manchette se retrouve dans des espèces très diverses (Afzelius et Dallai (3)). Chez la souris, la colchicine ne modifie que peu les MT de la manchette, mais paraît diminuer les liaisons entre les MT de celle-ci (Handel (80)). Mentionnons l'évolution complexe de la manchette de MT périnucléaires au cours de la maturation des spermatozoïdes des Oligochètes (Jamieson et Daddow (101)). Les relations entre MT et noyau sont donc étroites dans des spermatogénèses d'espèces très diverses, sans que l'on sache avec précision si la forme du noyau est liée à la présence des MT.

d. Les cellules végétales

Les relations entre les MT et la forme des cellules ont été observées dès les premiers travaux sur la colchicine, sous la forme des renflements radiculaires caractéristiques observés dans les radicules d'*Allium* immergées dans une solution de l'alcaloïde (A. Dustin *et al.* (56)). Toutefois, l'explication de ces lésions ainsi que d'autres déformations cellulaires produites par la colchicine (cf. Eigsti et Dustin (62)) ne fut fournie que par le découverte des MT. Dès 1963, Ledbetter et Porter (114) montraient que l'orientation des fibrilles celluloses de la paroi cellulaire était souvent parallèle à celles des MT voisins de la membrane cellulaire.

Ce fait a été confirmé par de nombreux auteurs, bien que les relations exactes entre MT—situés dans le cytoplasme—et fibrilles—extracellulaires—soient encore mal com-

prises. Mentionnons quelques travaux publiés ces dernières années. Les poisons des MT n'affectent pas toujours l'orientation des fibrilles cellulotiques, qui sont à une distance assez grande des MT corticaux (Robinson (163)). Une étude détaillée des racines d'*Azolla* a montré que le froid, ou la colchicine ($5 \times 10^{-3}M$, pendant plusieurs heures) ne détruisaient pas les MT mais augmentaient le nombre de MT courts ainsi que les MT en forme de C (que l'on considère comme un aspect de l'assemblage ou du désassemblage (Hardham et Gunning (81)). Les mêmes auteurs ont étudié en 1979 (81) les relations entre MT et croissance cellulaire, problème rendu difficile dans les cellules végétales par l'absence de MTOC apparents: l'hypothèse que la paroi cellulaire remplisse ce rôle est proposée (tout au moins pour les MT corticaux). Seagull et Heath (1980), reprenant l'analyse des MT corticaux des radicules du radis montrent l'association des MT avec des protéines diverses. Les MT étant plus courts que les fibres cellulotiques, les auteurs imaginent qu'ils détermineraient la polarité de celles-ci en subissant des phénomènes de glissement les uns par rapport aux autres, mais la cause de l'orientation des MT eux-mêmes demeure tout à fait inconnue.

Cette question de la localisation des MT des cellules végétales est particulièrement évidente au moment de l'entrée en mitose. Dans plusieurs espèces, il se forme alors un *anneau préprophasique*, équatorial, de MT périphériques. La localisation de ces MT détermine l'emplacement futur du plan de formation de la membrane cellulotique qui séparera les deux cellules-filles. Ceci est d'autant plus remarquable que dans des divisions asymétriques (par exemple celles observées dans la formation de stomates) cette bande de MT est asymétrique (cf. Galatis et Mitroakos (75)). La rela-

tion entre la formation des fibrilles cellulotiques et les MT est évidente, mais le mécanisme de l'assemblage (passager) de ceux-ci en un endroit préférentiel de la cellule est inconnu (cf. aussi Busby et Gunning (33a)). On peut conclure de ces observations que des liens existent entre la disposition des MT sous-corticaux et les plans de formation des fibrilles cellulotiques de la paroi, mais que les mécanismes biochimiques de cette interaction ne sont pas connus, et que l'orientation même des MT demeure inexpliquée.

Nous avons dit que les MT végétaux étaient particulièrement résistants aux poisons tels que la colchicine. Cependant, des études par immunofluorescence ont montré que les tubulines des Plantes avaient les mêmes propriétés antigéniques que celles des Animaux. Mentionnons à ce sujet les belles observations de Powell *et al.* (154) qui ont mis en évidence des MT de protoplastes de l'algue *Physcomitrella patens* au moyen d'anticorps de lapin dirigés contre de la tubuline d'origine bovine, et de Wick *et al.* (217) qui ont coloré les MT de cellules radicaires d'*Allium cepa* par des anticorps formés chez le lapin contre la tubuline de porc. Les MT du fuseau mitotique, et ceux de la bande équatoriale préprophasique sont remarquablement mis en évidence.

e. Protozoaires

C'est dans le groupe des Unicellulaires que l'on rencontre les interrelations les plus complexes entre MT et forme cellulaire. Ici comme dans d'autres cellules, les structures formées de MT et qui conditionnent la forme d'organites comme les paniers cytopharyngés ou les axonèmes des Hélozoaires, résultent de l'assemblage de nombreux MT par l'intermédiaire de "ponts" dont la nature demeure mal connue. Les structures géométriques les plus

diverses peuvent se rencontrer: lames formées de MT soudées côte à côte, structures spirales, assemblage à symétrie hexagonale, etc... L'intérêt de certaines de ces structures est leur labilité (sous l'influence du froid, des ultrasons, des pressions hydrostatiques élevées), l'assemblage de MT se détruisant en quelques minutes pour se reformer ensuite.

Les axonèmes des Héliozaïres ont été particulièrement bien étudiés (cf. Cachon et Cachon (33)). Plus récemment, la structure des longs prolongements des Foraminifères a été bien décrite par Travis et Allen (204): la disposition parallèle des MT dans les fines expansions du cytoplasme, et l'observation de mouvements divers au voisinage des MT, rappellent de façon surprenante la structure des axones. Nous verrons plus loin les relations entre ces mouvements et les MT. Ceux-ci remplissent le rôle de structures squelettiques, les longs bras des Héliozaïres se rétractant quand les MT sont détruits. La reformation des MT montre le caractère tout à fait réversible de ces structures, et pose à nouveau le problème du déterminisme de leurs agencements géométriquement complexes. La base des MT étant en contact avec la membrane nucléaire, il est probable que c'est à ce niveau qu'est déterminé l'agencement spiral des MT, chez *Echinospaerium* (Jones et Tucker (104)).

3.4. Conclusions

Ces quelques exemples indiquent bien que la forme de cellules ou d'organites cellulaires paraît déterminée par l'emplacement et l'agencement des MT, probablement associés à d'autres protéines. Cependant, ce cytosquelette microtubulaire est une structure labile capable, comme d'autres MT, de se désassembler parfois très rapidement, et de se reformer plus

tard. Les relations des MT avec d'autres protéines cytosquelettiques fibreuses, comme lacytokératine et la vimentine, qui représentent des structures plus stables, montrent que le rôle fondamental des MT n'est pas celui d'une structure de soutien passive, mais plutôt d'un échafaudage pouvant à tout moment —et particulièrement au cours de la mitose— être ramené à ses éléments constitutifs, les dimères de tubuline. Un problème important est posé par ces observations: celui du déterminisme de la localisation de l'assemblage des MT. Dans les cellules animales, le rôle des centrioles paraît capital, mais chez les Plantes dépourvues de centrioles, la nature des MTOC est mal comprise.

4. Microtubules et mouvements cellulaires

Dans des circonstances très variées, des mouvements par saccades, "saltatoires", de particules cytoplasmiques sont observés le long des MT, qui paraissent agir comme guides. L'existence de liaisons entre le mouvement de divers organites cellulaires et de particules comme des grains de mélanine ou de sécrétion, et les MT suggère que des protéines comparables à la *dynéine* (cf. plus bas) puissent jouer un rôle. L'inhibition de ces mouvements par les poisons des MT, même lorsque ces derniers sont loin d'être tous détruits, atteste d'une relation étroite entre mouvement et MT. Son étude est une excellente introduction à celle des mouvements mitotiques des chromosomes que nous décrirons plus loin. Nous considérerons ici quelques acquisitions récentes au sujet de plusieurs types de mouvements associés à l'intégrité des MT. Nous les comparerons ensuite aux mouvements ciliaires, dont le mécanisme est le mieux connu.

4.1. *Mouvements des granules de pigment dans les mélanophores*

Les cellules pigmentées, notamment celles des écailles de poissons, se prêtent très bien à l'étude des mouvements intracellulaires des granules, qui peuvent être étudiés dans des cellules isolées. Une importante littérature existe à ce sujet, montrant que l'agrégation des granules (avec palissement de la couleur) est inhibé par divers poisons, comme la colchicine, la vinblastine, la vincristine, qui par ailleurs favorisent la dispersion des granules, donc le noircissement (cf. Dustin (58)). Ces résultats ont été d'abord interprétés en termes de destruction des MT (Porter (153)).

Toutefois, des études des MT avec de meilleures techniques de microscopie, ont montré que le nombre des MT ne changeait pas lors des variations de la coloration: tout se passe donc comme si les granules pigmentaires glissent le long des MT, l'agent moteur étant éventuellement une autre protéine, qui pourrait s'attacher aux MT mais qui n'est pas l'actine (Murphy et Pilney (139); Schliwa *et al.* (175)). Schliwa et Euteneuer (171, 172) qui ont fait une estimation quantitative du nombre total des MT dans les mélanophores du poisson *Pterophyllum scalare*, ont étudié l'action du froid et de la colchicine, qui ensemble détruisent tous les MT de ces cellules, sans toutefois empêcher complètement l'agrégation du pigment sous l'influence de l'adrénaline. Cette agrégation étant inhibée par la cytochalasine B, les auteurs concluent que des facteurs indépendants des MT, en relation avec les microtrabécules (cf. plus haut) pourraient intervenir dans ces mouvements (nous retrouverons une hypothèse analogue dans l'étude des mouvements observés dans les axones).

Une observation intéressante est que la polarité des MT, étudiée par la technique

mentionnée plus haut (cellules traitées par détergents et mises dans une solution de tubuline), des mélanophores de *Pterophyllum* indique qu'ils sont tous orientés avec leur origine dans la région des centrioles, et leur extrémité + à la périphérie. McIntosh *et al.* (123). Ceci indique donc que des mouvements bidirectionnels se produisent au niveau (ou au voisinage immédiat) de MT avec une polarité unique: c'est aussi un fait que l'on retrouve dans les axones du système nerveux.

4.2. *Cellules sécrétoires*

Dans la plupart des cellules sécrétoires, les granules se forment au niveau de l'appareil de Golgi, et sont ensuite transportés vers la surface où ils se mettent en contact intime avec la membrane cellulaire pour s'ouvrir à l'extérieur. Ceci est vrai aussi bien pour les sécrétions endocrines qu'exocrines. De nombreux travaux ont montré que certaines étapes de la sécrétion étaient inhibés si les microtubules étaient altérés par la colchicine ou d'autres poisons. Cependant, ces recherches ont souvent conduit à utiliser des doses assez élevées de colchicine, et la possibilité d'actions pharmacodynamiques secondaires, indépendants des MT, n'est pas toujours bien écartée. Il semble d'ailleurs que parfois les sécrétions sont perturbées alors que les MT ne sont pas entièrement désassemblés (cf. Dustin (57)).

La liste des sécrétions inhibées par la colchicine ou les alcaloïdes de la pervenche (surtout la vinblastine) est longue, et nous ne donnons ici que quelques exemples. Dans le foie, la sécrétion des lipoprotéines, de la β -glucuronidase, des acides biliaires, de la phosphatase alcaline est inhibée; les sécrétions de la glande mammaire (lipides, caséine), des glandes gastriques (pepsinogène, gastrine) de la parotide

(amylase), des pneumocytes II (Mettler *et al.* (137)), des plasmotocytes (anticorps), du collagène par les fibroblastes, sont affectés. Dans le groupe des glandes endocrines, les recherches ont démontré une inhibition de la sécrétion d'insuline, du glucagon, d'hormones de croissance, de la prolactine, des hormones d'origine hypothalamique, etc... (cf. Dustin (57)).

Nous ne pouvons que mentionner ces résultats, témoignant donc tous de phénomènes d'inhibition, bien qu'il soit établi que la phase finale de la sécrétion, l'ouverture des granules sécrétoires à l'extérieur, soit indépendante des MT et pourrait faire intervenir les MF situés près de la membrane cellulaire. Lorsqu'on compare l'ensemble de ces résultats, on est frappé par l'atteinte très fréquente de l'appareil de Golgi. En effet, la destruction des MT, dans des cellules très diverses, a pour effet de conduire à une dispersion des vésicules golgiennes, et il se pourrait que les troubles de la sécrétion soient plus la conséquence de cette lésion cellulaire que d'un blocage du transport des granules entre l'appareil de Golgi et la surface cellulaire. Cette perte de polarité de l'appareil de Golgi a été signalée récemment au niveau des hépatocytes (De Brabander *et al.* (52)), la glande mammaire (Nickerson *et al.* (141)), les cellules B des îlots de Langerhans (Malaisse-Lagae *et al.* (127)) et dans les plasmotocytes où les immunoglobulines non sécrétées s'accumulent dans les vésicules golgiennes (Antoine *et al.* (8)).

Bien que la dispersion de l'appareil de Golgi puisse rendre compte des troubles de la sécrétion, d'autres mécanismes en rapport avec les MT sont possibles. C'est ainsi que Reaven et Azhar (1981) ont étudié

l'action de membranes cellulaires sur les tubulines. Les phospholipides à charge négative (cardiolipine et phosphatidylsérine) sont les plus actifs; les membranes golgiennes se fixent à la tubuline et la précipitent des solutions acide. Rappelons que de nombreux polyanions (acide ribonucléique, acide poly (L) glutamique, polyagarose, carboxyméthylcellulose) inhibent *in vitro* l'assemblage des MT, peut-être par une action liée aux MAPs (cf. Dustin (58)).

On ne peut écarter l'action d'autres facteurs, comme le taux du Ca^{2+} et celui de l'AMP cyclique, qui sont tous deux liés aux activités sécrétoires et influencent les MT.

En conclusion, l'intégrité des MT est nécessaire au transport des granules de sécrétion de l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire (mais non à la sortie de la cellule). Les expériences font apparaître la complexité de cette action, et le rôle de l'appareil de Golgi, dont l'intégrité dépend du cytosquelette microtubulaire de la cellule.

4.3. Le transport neuroplasmique ou «flux axonal»

C'est à partir du tissu cérébral que l'on prépare le plus souvent la tubuline, et la richesse de cet organe en MT s'explique par leur présence dans tous les axones et les dendrites, à côté des neurofilaments. Des poisons comme la colchicine peuvent bloquer le transport de substances diverses, par exemple des granules de neurosécrétion, dans les axones, indiquant une participation des MT, bien que ceux-ci n'apparaissent pas détruits. (Flament-Durand et Dustin (65); Parish *et al.* (146)) (fig. 13).

Cependant, les problèmes liés au transport, dans les axones et les dendrites, de molécules de taille variée, souvent dans deux directions (centrifuge et centripète), à des vitesses différentes, sont d'une grande

(*) Workshop on Axoplasmic Transport, Schloss Elmau, April-May, 1981. Dustin, P., Flament-Durant, J.: Disturbances of axoplasmic transport in Alzheimer's disease.

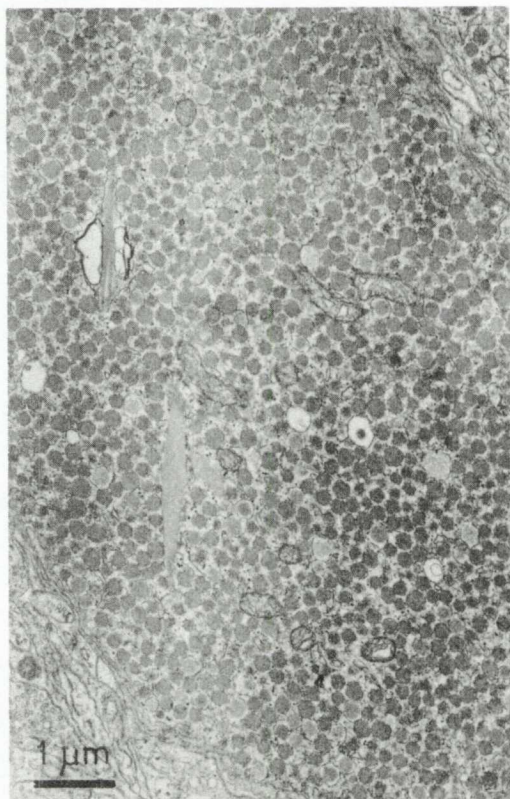


Fig. 13. Noyau para-ventriculaire du rat: blocage du transport des grains de neurosécrétions vers le lobe postérieur de l'hypophyse, après deux injections intraventriculaires de 100 μ g de colchicine (Flament-Durant et Dustin, 1972). La figure montre un axone considérablement distendu par l'accumulation de granules de neurosécrétat. On observe quelques inclusions allogènes dont la signification demeure obscure (lysosomes ?).

complexité. Mentionnons les revues publiées par Ochs et Worth (143); Schwartz (180); Grafstein et Forman (78), et un symposium récent (1981) en voie de publication (+). La complexité du problème est indiquée par le fait que les auteurs distinguent cinq vitesses différentes de transport. La plus rapide (200 à 400 mm/jour) affecte des glycoprotéines, l'acétylcholinestérase, la sérotonine, des structures membranaires ou vésiculaires; les vitesses intermédiaires (de 15 à 50 mm/jour) (groupes II et III)

sont en rapport avec les protéines mitochondriales et la myosine; le groupe IV (2 à 4 mm/jour) affecte l'actine, la calmoduline, l'énolase; enfin, le transport le plus lent (0,2 à 1 mm/jour) est celui des microtubules eux-mêmes et des protéines qui leur sont associées (Black et Lasek (18)). Nous ne considérerons ici que le transport rapide. Les mouvements des MT eux-même s'expliquent par la synthèse de ceux-ci dans le corps cellulaire et leur désassemblage au niveau des synapses (on sait très mal ce que deviennent à ce moment les tubulines libérées, certains documents montrant un contact étroit entre MT et membrane présynaptique). Rappelons à ce sujet qu'il semble que les MT des axones sont discontinus, ce qui implique qu'ils assemblent sans relation avec des MTOC (cf. plus haut).

De plus il existe, dans les axones, un flux neuroplasmique inverse, rétrograde, qui transporte des composants variés: enzymes lysosomiaux, "nerve growth factor" (NGF), virus. Ceci doit être rapproché de ce que nous avons vu dans les cellules pigmentées, où les granules se déplacent dans deux directions le long des MT. Le flux rétrograde est comparable au flux rapide, avec une vitesse un peu moindre (100-200 mm/jour). L'importance de ce transport rétrograde est grande en médecine: virus herpétique, toxine tétanique (cf. Schwab *et al.* (179)).

Les relations entre MT et transport rapide donnent encore lieu à des opinions contradictoires. Alors que de nombreux travaux montrent que la colchicine, les alcaloïdes de la Pervenche, la maytansine, etc... inhibent le flux axonal rapide (cf. Dustin (58)), certains ne pensent pas que les MT soient indispensables. Une des meilleures théories du flux axonal (Ochs et Worth (143)) ne présente d'ailleurs les MT que comme des guides le long desquels les

composants se déplaceraient à l'intervention d'une protéine contractile, qui pourrait être l'actine. De même, Stearns (189) suggère que des modifications des microtrabécules pourraient déplacer des particules, guidées par les MT, à l'intervention de modifications liées au taux local de Ca^{2+} . Cette conception est aussi défendue par Ochs (142) et appuyée par les données expérimentales de Brady *et al* (22). Ces derniers, étudiant le nerf sciatique du rat, montrent que le flux axonal est conservé dans des segments de nerf dont tous les MT ont été détruits par une incubation dans une solution riche en Ca^{2+} (75 mM). Ils soulignent, comme nous l'avons fait plus haut pour l'activité sécrétoire, que la colchicine (et d'autres poisons) peut agir sur d'autres récepteurs que les MT. Un argument de poids, qui paraît avoir été confirmé, est que la *colchicine*, qui n'est pas un poison des MT, bloque le flux axonal (Schönharting *et al.* (177); Edström *et al.* (61)).

Comme on le voit, dans le transport intra-axonal et intra-dendritique, les MT apparaissent plus comme des guides que comme la cause des mouvements, ceux-ci devant s'expliquer par l'intervention d'autres protéines (contractiles ?).

4.4. Les mouvements dans les axopodes

Nous avons mentionné le rôle des MT comme éléments cytosquelettiques dans les longs prolongements caractéristiques des Héliozoaires et des Foraminifères. Le long du groupe de MT centraux (axonème) des particules diverses, notamment utilisées pour l'alimentation de la cellule, se dirigent dans deux directions, animées de mouvements «saltatoires». Ce problème n'est pas sans ressemblance avec celui du flux neuroplasmique, et certaines images d'axopodes, avec leurs MT parallèles reliés

à divers organites par des extensions latérales, évoquent tout à fait celles des filets nerveux (cf. Travis et Allen, (204)) (fig. 4). Certains axonèmes ont de plus des propriétés de contractilité qui ne paraissent pas directement liés aux MT (Bloodgood (19)). On trouvera une revue de ces questions dans le chapitre publié par Hyams et Stebbings dans le livre de Roberts et Hyams (162).

Les axopodes d'*Allogromia laticollaris*, un foraminifère, ont été analysés par Allen *et al.* (5) utilisant une méthode d'enregistrement par télévision, ce qui permet une analyse fine de mouvements rapides. On constate que les organites cytoplasmiques qui se déplacent dans le réseau fibrillaire des axopodes sont en contact avec des MT, et ne se déplacent plus lorsqu'ils perdent ce contact. On observe aussi des mouvements latéraux et longitudinaux des MT eux-mêmes, qui contractent des liaisons latérales analogues à ce que l'on observe dans le fuseau mitotique. Dans ces axopodes, il y a un déplacement incessant de cytoplasme et de particules dans les deux directions: ces mouvements saltatoires atteignent des vitesses dépassant parfois 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Les MT sont indispensables au maintien de la forme des axopodes, et ceux-ci perdent leur rigidité après colchicine ou griséofulvine. Les MT sont reliés par des projections transversales. Les auteurs (Travis et Allen (204)) comparent à juste titre ces mouvements à ceux observés dans les nerfs. Un des composants de ces structures sont des MF de 5 nm de diamètre dont la nature chimique est inconnue.

Ici encore, les MT apparaissent surtout comme des guides, l'élément moteur étant peut être des protéines qui leur sont étroitement associées. Le caractère bidirectionnel du mouvement est analogue à celui décrit plus haut dans les cellules pigmentaires.

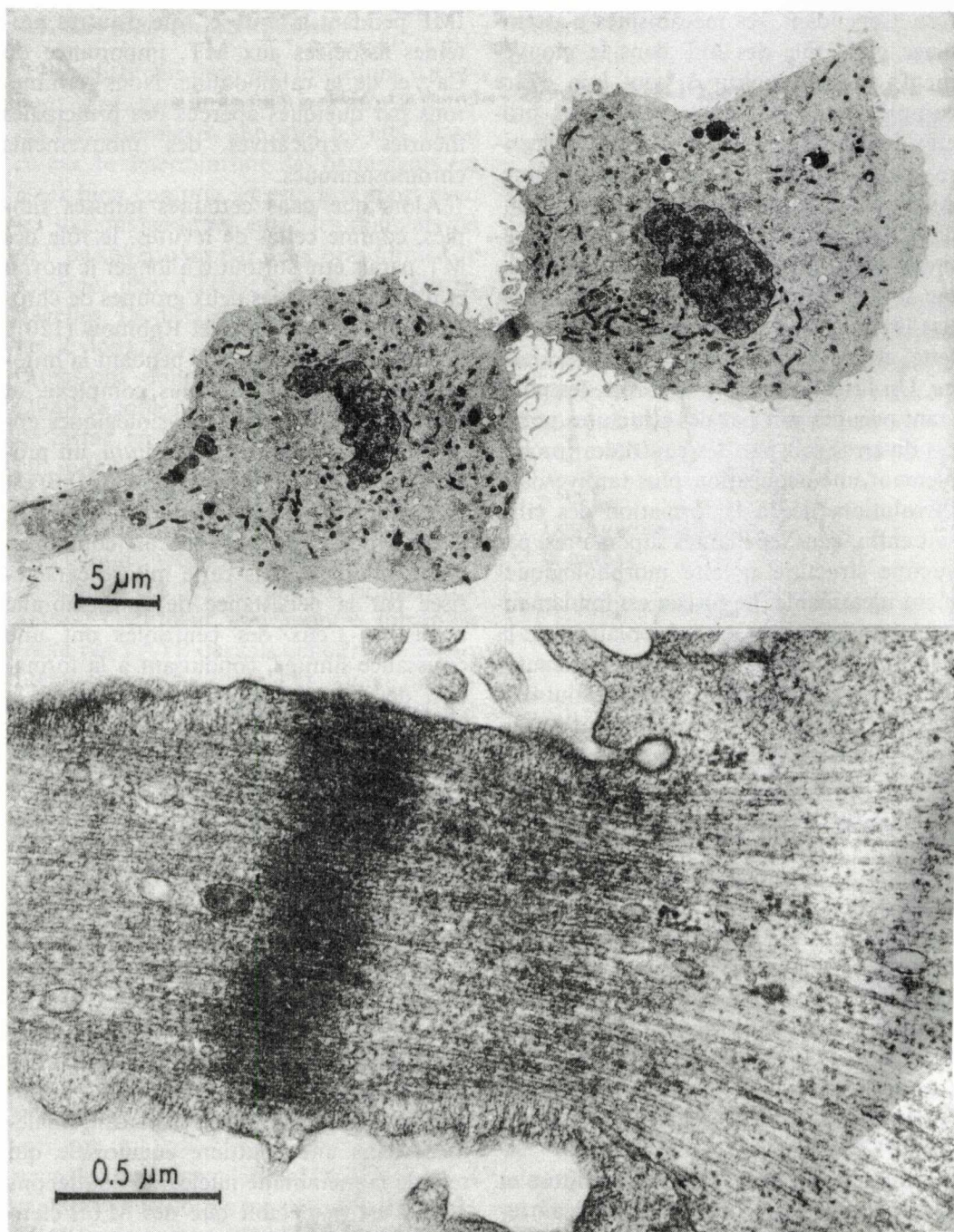


Fig. 14. Faisceau télophasique dans des cellules d'embryons de souris en culture (d'après De Brabander, Thèse, Bruxelles 1977) en haut: les deux cellules demeurent liées par un mince pont cytoplasmique, dont la partie centrale est plus dense. En bas: aspect à fort grossissement du pont télophasique: très nombreux MT paraissant s'entrecroiser dans la partie centrale où ils sont entourés d'un matériel dense de nature inconnue.

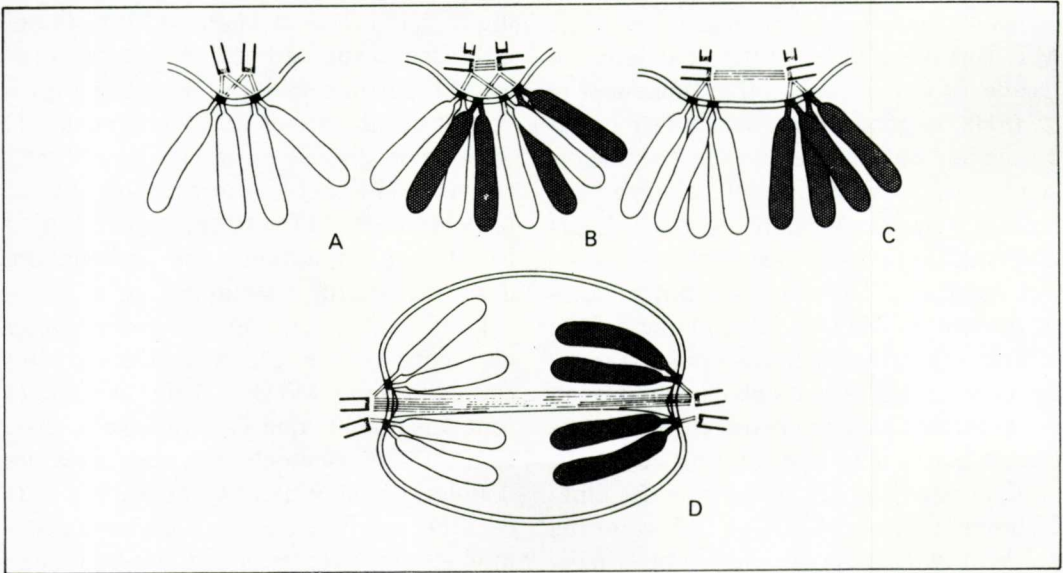


Fig. 15. Mitose de *Syndinium* sp. (simplifié, d'après Ris et Kubai, in Dustin, 1978).

A. Avant la mitose, les chromosomes médiocentriques sont attachés à une zone plus dense de la membrane nucléaire, qui est rattachée aux deux centrioles.

B. Les chromosomes se sont divisés, ainsi que leurs attaches à la membrane nucléaire et aux centrioles. Ceux-ci commencent à se dédoubler et un petit fuseau se forme entre les deux centrioles primitifs. A noter que chaque centriole est fixé à un groupe de chromosomes.

C. Le fuseau polaire s'allonge, et les centrioles se séparent, entraînant avec eux les deux groupes de chromosomes.

D. Le fuseau polaire a atteint ses dimensions maximales, et se trouve situé dans un repli de la membrane nucléaire. Les MT rattachant les chromosomes aux centrioles n'ont pas changé de longueur. Il y a maintenant deux centrioles à chaque pôle. La membrane nucléaire est demeurée intacte. L'allongement du fuseau polaire contraste avec la croissance très limitée des autres MT attachés aux centrioles, et celle des centrioles eux-mêmes.

portement différentiel des MT polaires et ceux attachés aux chromosomes: si nous laissons de côté les centrioles, nous retrouverons ces deux types de MT dans la plupart des mitoses, y compris celles des Vertébrés. On comprend donc qu'il doit exister plusieurs phénomènes régulateurs de l'assemblage des MT.

5.1. Polarité des MT du fuseau

Nous avons montré plus haut comment on peut déterminer la polarité des MT en observant l'orientation de lames de tubuline assemblées à leur surface. Cette métho-

de élégante, qui a confirmé des faits connus, comme la polarité uniforme des MT des axones (Burton et Paige (32)), apporte des résultats qui sont en contradiction avec certaines données expérimentales.

La critique que l'on peut lui adresser peut-être, est la nécessité de traiter d'abord les cellules par des détergents qui rompent la paroi cellulaire, et qui pourraient détruire certains MT.

Nous avons mentionné ce que l'on entendait par "centres organisateurs des MT" ou MTOC. Dans la mitose, on considère en général que les zones péricentriolaires (ou les autres structures polaires) jouent ce rôle, ce qui est clairement mis en

évidence par l'étude de la régénération des MT dans des cellules traitées par le nocodazole, et ensuite lavées (De Brabander *et al.* (51)), ou encore par l'assemblage de tubuline sur des cellules traitées par détergents à divers stades du cycle, comme l'ont montré Telzer et Rosenbaum (197). Leurs observations faites sur des centrioles isolés indiquent que l'appareil péricentriolaires ne devient un MTOC qu'au moment de la mitose. D'autres recherches ont aussi montré que les MT s'assemblaient au niveau des kinétochores lorsque des chromosomes étaient placés dans une solution de tubuline (Sloboda *et al.* (184)). Le rôle des kinétochores comme MTOC a été confirmé par Witt *et al.* (221) qui ont étudié la régénération des MT après colcémide dans des cellules CHO (du hamster), par Ris et Witt (161) pour les mêmes cellules, et par De Brabander *et al.* (50) dans des cellules PtK₂ après nocodazole.

Si les pôles d'une part, les kinétochores de l'autre, sont des sites d'assemblage des MT, on devrait s'attendre à ce que ces deux groupes de MT aient une polarité opposée, car il paraissait logique de penser que l'extrémité –soit attachée au MTOC, l'extrémité + où se produit la croissance, étant libre. Or, certaines théories de la mitose (Margolis *et al.* (132)) postulent que tous les MT de chaque hémifuseau ont la même polarité. Plus récemment divers résultats ont confirmé cette hypothèse: McIntosh *et al.* (123), dans les cellules mitotiques d'*Haemaphys*, ont montré que la disposition de lames de tubuline assemblées sur les MT indiquaient que les MT polaires et les K-MT de chaque demi-fuseau avaient la même polarité. (Heide-mann (86)), pour des cellules humaines (HeLa) est arrivé aux mêmes conclusions. Une confirmation de ces résultats –tout au moins en ce qui concerne le mollusque *Spisula*– a été obtenue par une autre tech-

nique par Telzer et Haimo (196): ils ont isolé les fuseaux de l'oeuf, et ont "décoré" les MT par une solution de dynéine (provenant des axonèmes de *Tetrahymena*): la dynéine se dispose en structures obliques autour des MT, et leur orientation indique la polarité des MT. Or, tous les MT d'un hémifuseau montrent une orientation, donc une polarité, identique.

Pour mettre ces données concordantes en accord avec le rôle évident des kinétochores comme MTOC, deux hypothèses sont possibles 1) que l'assemblage se fasse bien sur les kinétochores, mais avec les doublets de tubuline orientés comme ceux des MT polaires, c'est à dire avec l'extrémité –tournée vers le pôle. Cette hypothèse implique –ce qui n'est pas impossible– que l'assemblage se ferait au niveau de l'extrémité fixée au kinétochore, ou, vice-versa, que les MT polaires aient leur extrémité + tournée vers les pôles, et les KMT aussi. 2) que les MT polaires viennent secondairement se fixer sur les kinétochores (Tippit *et al.* (203)), ce qui est en contradiction avec plusieurs faits d'expérience.

Ces problèmes de polarité, sur lequel nous reviendrons en discutant les théories de la mitose, devraient trouver prochainement une solution.

5.2. Les cytosquelette et les IMF pendant la mitose

Bien que les MT, comme nous l'avons vu plus haut, peuvent jouer un rôle dans la forme des cellules, ils ne font en fait pas partie du cytosquelette, puisque pendant la mitose leur disposition se modifie tout à fait. Les éléments les plus stables paraissent être les IMF, et tout particulièrement, la cytokératine et la vimentine. Il est intéressant de constater que ces deux protéines fibrillaires ne se comportent pas de la

même façon: nous en avons déjà donné un exemple en montrant les modifications subies par la vimentine seule après destruction des MT.

Les IMF forment souvent un anneau périnucléaire: celui-ci dans des cellules endothéliales de cobaye en culture, se maintient pendant la mitose, encerclant les deux noyaux-fils et se reformant rapidement après la télophase (dans les cellules binucléées obtenues après cytochalasine—qui affecte les MF d'actine— les IMF encerclent des deux noyaux voisins) (Blose (20)). Aubin *et al.* (9) ont montré ensuite (dans des cellules PtK2) que des deux types de IMF, la vimentine était la plus stable, et formait l'anneau périnucléaire qui entoure le fuseau mitotique. Par contre, la lacytokératine conservait une répartition plus diffuse dans la cellule en mitose, participant ainsi au maintien de la forme générale de celle-ci. Une étude biochimique des "cages" de IMF entourant les figures mitotiques des cellules HeLa a confirmé la présence de vimentine (bien qu'il s'agisse de cellules épithéliales), à côté d'autres protéines. La disposition des fibres de vimentine expliquerait le fait classique que les organites cellulaires sont maintenus en dehors du fuseau mitotique. Les récentes observations de Horwitz *et al.* (94) montrant une disposition granulaire de lacytokératine pendant la mitose après colchicine dans les cellules PtK2 demandent à être confirmées.

5.3. Autres protéines associées au fuseau

En ce qui concerne les MAPs, rappelons que ces protéines de poids moléculaire élevé ne sont pas nécessairement associées aux MT. Dans les cellules humaines HeLa, des anticorps préparés contre des MAP de 210.000 et 125.000 de poids moléculaire

colorent les MT tant dans les cellules interphasiques qu'au cours de la mitose (Bulinski et Borisy (28)). Ces MAPs des cellules HeLa sont toutefois antigéniquement différentes de celles du cerveau. Elles se retrouvent dans les MT et le fuseau de l'homme et de primates, mais pas chez les rongeurs ou la poule (Bulinski et Borisy (28)). De leur côté, Kuznetsov *et al.* (113) ont montré que des anticorps dirigés contre MAP2 mettaient en évidence les MT interphasiques et fusoriaux; dans ces expériences, les antigènes et les cellules provenaient tous deux de la même espèce animale, le boeuf. Il est évident que l'on aimerait en savoir plus sur le rôle fonctionnel de ces diverses protéines et sur leur répartition dans d'autres types de mitoses (Plantes, Unicellulaires, etc...).

La présence possible d'actine dans le fuseau mitotique demeure toujours un objet controversé. Forer (cf. Forer et Jackson (67)) a décelé de l'actine, au moyen de la "décoration" par la méromyosine lourde, dans les fuseaux de l'insecte *Nephrotoma suturalis* et les cellules d'*Haemantus*. L'orientation des molécules de méromyosine montrait des MF polarisés, s'attachant aux kinétochores et ayant des relations directes avec les MT du fuseau. Ces résultats, sans apporter une preuve, indiqueraient que l'actine joue un rôle dans les mouvements mitotiques. Herman et Pollard (89) ont confirmé, dans des cellules PtK2 que les fibres fusoriales pouvaient être mises en évidence par des anticorps anti-actine ou par la fixation de méromyosine lourde. On a aussi montré, par immunofluorescence, une coloration diffuse du fuseau par des anticorps dirigés contre la myosine (Fujiwara et Pollard (74)). Enfin, rappelons que la *dynéine*, la protéine contractile des cils, peut se fixer électivement sur les MT du fuseau (Telzer et Haimo (196)). Cette observation est à rapprocher des résultats de

Prat *et al.* (155) qui ont isolé des fuseaux mitotiques de l'embryon d'Oursin (*Strongylocentrotus*) une ATPase activée par le Mg^{2+} qui serait une forme de dynéine. Par contre Zieve et McIntosh (226) n'ont pas pu déceler de dynéine dans le fuseau de fibroblastes bovins. Malgré ces résultats, un doute plane encore sur le rôle de l'actine (ou d'une protéine voisine) dans le fuseau mitotique et son intervention possible dans les mouvements des chromosomes.

5.4. Rôle du calcium et de la calmoduline

Nous avons souligné que l'assemblage des tubulines en MT ne pouvait se faire, *in vitro*, qu'en présence de taux très faibles de Ca^{2+} . De plus, de nombreuses observations montrent la désintégration rapide des MT dès que le taux intracellulaire de Ca^{2+} s'élève excessivement: Schliwa (170) en montrant la destruction progressive des axonèmes d'Héliozaïres en présence d'une solution de 0,5 mM de Ca^{2+} et de l'ionophore A23187, avait émis l'hypothèse que le taux du Ca^{2+} puisse être un facteur régulateur des MT. Des progrès importants des connaissances sur la régulation intracellulaire du taux du Ca^{2+} ont été accomplis ces dernières années, par suite de la découverte de la *calmoduline*, un facteur qui règle l'activation par le Ca^{2+} de divers systèmes enzymatiques (cf. Klee *et al.* (112)).

L'hypothèse que des variations minimales du taux du Ca^{2+} intracellulaire puissent entraîner le désassemblage des MT, a bénéficié d'études qui ont montré la présence de calmoduline —décelée par des techniques immunohistochimiques— dans le fuseau mitotique, et plus précisément dans les régions où l'on pense que les MT sont désassemblés, aux pôles du fuseau. Alors que la calmoduline, dans la cellule interphasique, est sans localisation précise, on voit qu'elle

se fixe aux pôles de la mitose à l'ana et la télophase, ainsi qu'aux extrémités du corps télophasique (Andersen *et al.* (7)). Ces observations, faites sur des cellules HeLa, ont été confirmées pour d'autres lignées de cellules animales (Marcum *et al.* (129); Welsh *et al.* (215); De Mey *et al.* (53); Rebhun *et al.* (159)). L'action de la calmoduline est probablement complexe, et Rebhun *et al.* (159) suggèrent qu'elle interviendrait au niveau des MAPs, qui ont une action protectrice des MT vis-à-vis du Ca^{2+} . Il faut certainement retenir la relation topographique entre la calmoduline et certaines régions du fuseau: comme les figures de De Mey *et al.* (53), le montrent très clairement, tout le fuseau n'est pas coloré par des anticorps anti-calmoduline, mais seulement les extrémités voisines des deux pôles: or, à la télophase, c'est logiquement là que les sous-unités de tubuline doivent être libérées à partir des MT.

Toutefois, si l'on admet que le Ca^{2+} est un élément régulateur de la mitose, par l'intermédiaire de la calmoduline, le problème des mouvements intracellulaires de Ca^{2+} demeure posé. Quelques indications récentes suggèrent que des structures vésiculaires et lamellaires associées au fuseau mitotique pourraient remplir cette fonction. Hepler (87) dans une étude de la mitose de l'orge (*Hordeum vulgare*) a montré l'étroite association de telles structures avec le fuseau mitotique, et pense que le réticulum endoplasmique lisse (à la manière du réticulum sarcoplasmique du muscle) pourrait contrôler le taux du Ca^{2+} pendant la mitose. Silver *et al.* (182) sur un tout autre matériel, les embryons d'oursin, ont isolé à partir de l'appareil mitotique une fraction vésiculaire particulière qui séquestre le ^{45}Ca . Ils croient que la libération de Ca^{2+} à partir de ces structures pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'assemblage des tubulines dans la mitose. Dans

des cellules végétales diverses, la mise en évidence histochimique du Ca^{2+} soit par la chlorotétracycline (Wolniak *et al.* (222)) soit par précipitation par l'antimonate de potassium (Wick et Hepler (216)) a confirmé que le calcium se trouvait, en dehors des mitochondries, dans les citernes de réticulum endoplasmique lisse entourant le fuseau mitotique. Enfin, des résultats comparables ont été obtenus en étudiant la répartition des vésicules du réticulum endoplasmique lisse dans les mitoses des cellules HeLa: elles pourraient constituer un système de séquestration du calcium et sont en relations étroites avec les MT du fuseau. Paweletz et Finze (147)).

Signalons enfin, dans ce domaine en évolution rapide, les résultats très récents de Sobue *et al.* (187) qui concluent que la calmoduline se lie de façon spécifique à la protéine *tau*, dont on connaît le rôle dans l'assemblage des MT, cette liaison étant en rapport avec le taux de Ca^{2+} . Ni la tubuline ni les autres MAPs ne se liant à la calmoduline Kakiuchi et Sobue (105) pensent que l'association de la calmoduline, en présence de Ca^{2+} , à la protéine *tau* est un facteur régulateur de l'équilibre tubuline-MT.

5.5. Mécanisme des mouvements mitotiques

Il est intéressant de voir comment les données nouvelles éclairent le problème fondamental de la mitose, le mouvement des chromosomes. Nous ne pouvons envisager ici plusieurs autres questions, reduplication des centrioles, régulation de l'entrée en mitose, mouvements des chromosomes entre la prophase et la métaphase, cytodièrese. Nous limitons donc à la translation des chromosomes de la plaque métaphasique vers les pôles et à la télophase.

Un point important est que ces mouvements sont lents: ils ne peuvent être comparés par exemple aux mouvements saltatoires, ou à ceux du flux neuropasmique rapide, encore moins aux mouvements ciliaires. On a estimé que les besoins, énergétiques de la mitose étaient insignifiants — quelques molécules d'ATP. Si l'on envisage donc l'intervention possible de protéines contractiles comme l'actine, ces protéines peuvent être présentes en faible quantité, ce qui explique peut-être les résultats contradictoires à leur sujet.

Deux conceptions s'opposent encore en ce qui concerne le déplacement des chromosomes et ses relations avec les MT (cf. Jacobs et Cavalier-Smith (100); Dustin (58); McIntosh (121)). Pour le *désassemblage* des MT qui prend place tant à la zone équatoriale qu'aux pôles du fuseau suffirait à lui seul à amener les chromosomes vers les pôles. Ceux-ci, lors de la télophase, s'éloignent souvent les uns des autres, ce qui s'expliquerait par l'allongement des MT polaires par l'addition de nouvelles sous-unités de tubuline. La seconde théorie souligne l'importance de phénomènes de *glissement* de MT les uns par rapport aux autres, comparables à ce que l'on connaît dans la contraction musculaire. Elle implique la formation de ponts entre MT, ponts éventuellement constitués par une protéine du groupe de l'actine. Elle insiste de plus sur le fait que les MT de polarité intrinsèque différente glisseraient en sens opposé les uns par rapport aux autres.

La première théorie implique que la disparition des MT suffise à mouvoir les chromosomes. Elle tient compte de l'état d'équilibre dynamique des MT mitotiques — ceux-ci, d'après des documents microcinématographiques, subissent des remaniements constants au cours de la mitose. Cependant, il est très difficile d'admettre

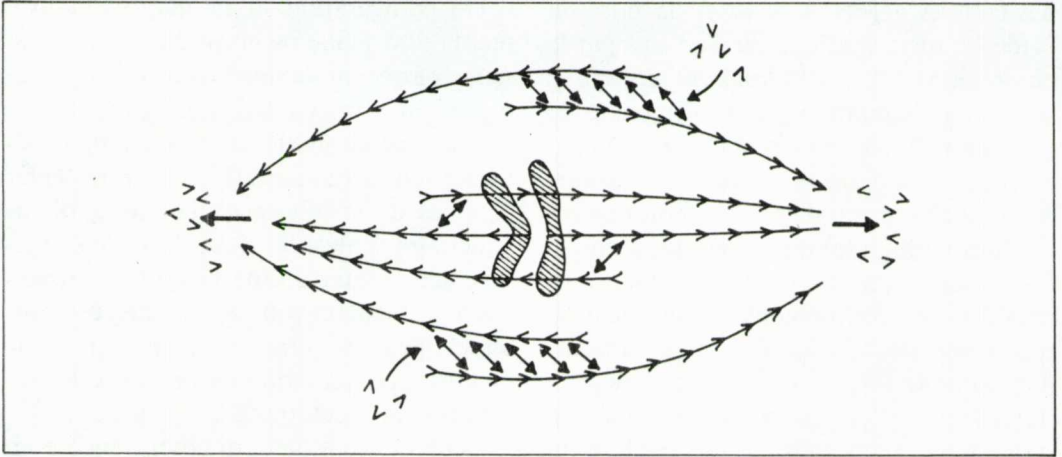


Fig. 16. Polarité des MT du fuseau mitotique (légèrement modifié, d'après Margolis *et al.* (1978). Les MT polaires et les MT attachés aux kinétochores ont la même polarité. Ils s'assemblent dans la région équatoriale de la cellule, et au niveau des kinétochores, et se désassemblent aux pôles. Les mouvements mitotiques résulteraient de l'interaction (flèches) de MT de polarité opposée.

que la destruction d'une structure de soutien puisse à elle seule déplacer les chromosomes d'une façon aussi programmée que dans la mitose. De plus, les expériences d'irradiation ultraviolette localisée des MT du fuseau montrent que les mouvements persistent même lorsqu'une partie des MT est altérée (Forer (66)). Il existe aussi, au sein du fuseau mitotique, un flux dirigé vers les pôles qui peut être visualisé par le déplacement de particules le long des MT (Bajer (11)). Le mécanisme causal de ce mouvement n'est pas mieux connu que celui du flux neuroplasmique auquel il ressemble.

La seconde théorie implique donc des MT polarisés –ce qui est le cas– et des interrelations entre MT de polarité opposée à l'intervention probable d'autres facteurs. Elle explique plusieurs phénomènes de la mitose, en particulier l'allongement du fuseau, qui résulterait du glissement des MT venus des deux pôles les uns par rapport aux autres. Elle explique aussi assez bien l'évolution et l'allongement du corps téléphasique. Elle implique évidemment

aussi le désassemblage des sous-unités de tubuline au niveau des pôles. Elle se heurte actuellement à un problème évoqué plus haut, qui est celui de la polarité des MT. Nous avons proposé une explication (Dustin (58) et (59)) qui se basait sur l'assemblage des MT polaires aux pôles et des K-MT sur les kinétochores. Ces deux types de MT, dans chaque hémifuseau, auraient une polarité opposée, ce qui expliquerait les mouvements de l'ana-télophase. Nous avons signalé plus haut que plusieurs observations concluent actuellement à une polarité identique de tous les MT de chaque hémifuseau. Ce fait ramène, pour expliquer les mouvements mitotiques, la théorie proposée en 1978 par Margolis *et al.* (132) (fig. 16).

Pour ces auteurs, les microtubules sont en état dynamique, s'assemblant à une extrémité et se désassemblant à l'autre: la première serait dans la zone équatoriale, la seconde aux pôles. Les kinétochores, situés à la métaphase près de l'équateur, formeraient des MT orientés vers les pôles. Ceux-ci seraient uniquement des zones de

désassemblage –hypothèse en contradiction avec les observations, mentionnées plus haut, l'assemblage des MT au niveau des structures péricentriolaires ou des plaques polaires. A la métaphase, selon Margolis *et al.* (132), l'équilibre de la plaque équatoriale est acquis par suite des interrelations entre les K-MT et les MT polaires. A l'anaphase, les plus longs MT polaires glisseraient les uns par rapport aux autres pour former le corps télophasique, cependant que les MT seraient désassemblés aux pôles. Cette conception est donc en accord avec ce que l'on sait aujourd'hui de la polarité des MT; elle explique sans doute fort bien la formation de la plaque équatoriale, mais rend mal compte des mouvements des chromosomes vers les pôles, à moins de penser que le renouvellement constant des MT par "treadmilling" soit la cause des mouvements.

En conclusion, le déterminisme des mouvements mitotiques demeure mal compris. Le rôle du Ca^{2+} et de la calmoduline, celui des MTOC (polaires ou kinétochoriaux), la signification du "treadmilling", l'intervention possible de protéines du type de l'actine, les interrelations de MT de polarité opposée, sont autant de facteurs dont toute théorie cohérente doit tenir compte. On souhaiterait qu'une telle théorie s'applique aussi bien aux divisions des cellules les plus simples, où on ne voit guère plus qu'un faisceau central de MT en voie d'allongement qu'aux mitoses les plus complexes avec centrioles, corps péricentriolaires, kinétochores, réservoirs de calcium, etc...

6. Résumé

L'auteur rappelle les principales propriétés des microtubules (MT) et de leurs protéines constitutives –tubulines et pro-

téines associées (MAPs). Il analyse les problèmes posés par l'assemblage *in vivo* et *in vitro* des MT, le rôle de MAP1 et MAP2 ainsi que du facteur *tau*, la signification de la tyrosilation de la tubuline α , les relations entre guanine nucléotides et assemblage. L'importance du calcium et de la calmoduline sont soulignés. Le rôle des centres organisateurs (MTOC) et la polarité des MT sont discutés.

Le mode d'action des poisons des MT, en particulier la colchicine, est discuté à la lumière du problème de l'assemblage des MT. La sensibilité particulière des lymphocytes leucémiques humains à la colchicine est notée. Contrairement aux données classiques, plusieurs travaux récents indiquent que la colchicine, en désassemblant les MT, pourrait stimuler la synthèse de DNA et la mitose. Les modifications de microfilaments intermédiaires (IMF) après colchicine sont une observation importante pour comprendre le mode d'action de l'alkaloïde sur diverses fonctions cellulaires. Parmi les autres nombreux poisons des MT, les dérivés du benzimidazole sont particulièrement intéressants par suite de la réversibilité rapide de leur action. Les effets des poisons chimiques sont comparés à ceux du froid. L'action du taxol, qui stabilise les MT, permet leur assemblage à basse température et augmente le nombre de MT dans les cellules, est une découverte récente d'un grand intérêt.

Les modifications des MT entraînent des changements du cytosquelette cellulaire, et tout particulièrement des IMF formés de vimentine. Le rôle cytosquelettique des MT dans les érythrocytes, les plaquettes sanguines, les spermatozoïdes, les cellules végétales et les Protozoaires est souligné.

Les MT sont en relation avec divers mouvements cellulaires: déplacements des granules pigmentés dans les mélanophores, mouvements des grains de sécrétion, flux

neuroplasmique. Dans tous ces exemples, les MT apparaissent jouer le rôle de guides, l'agent moteur étant le plus souvent inconnu. Les mouvements observés dans les axopodes des Héliozaïres et Foraminifères ainsi que le déterminisme des mouvements ciliaires (ces derniers liés à l'activité de la dynéine) sont rapidement passés en revue.

REMERCIEMENTS

Les recherches personnelles de l'auteur ont bénéficié du crédit n.º 3.4512.80 accordé par les Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (Bruxelles).

Enfin, la participation des MT, dans les mouvements des chromosomes et les différentes théories explicatives de la mitose sont discutés, à la lumière des connaissances actuelles sur la polarité des MT, le rôle du Ca^{2+} et de calmoduline et celui des IMF et des MAPs.

Madame J. De Ligne a assuré la dactylographie et la préparation du manuscrit; je désire l'en remercier ici.

BIBLIOGRAPHIE

Avertissement. Le nombre de travaux publiés chaque année et se rapportant aux microtubules dépasse 500. Il est de ce fait difficile de ne pas omettre certains travaux, surtout si leur titre ne fait pas apparaître clairement qu'il s'agit de microtubules ou de poisons agissant sur ceux-ci. Nous nous sommes basés sur l'importante collection de tirés à part en notre possession, et n'ignorons pas que certains travaux, publiés dans des revues auxquelles nous n'avons pas accès, et dont nous n'avons pas reçu de tirés à part, peuvent nous avoir échappé.

1. AFZELIUS, B. A. Genetic disorders of cilia. In: *Cell Biol.*, Schweiger H. G., edit., Springer Verlag, Berlin, 440-447 (1981).
2. AFZELIUS, B. A., DALLAI, R. Cytological features of spermatozoa and spermiogenesis in some Neuroptera. *Biol. cell.* 35:281-288 (1979).
3. AFZELIUS, B. A., ELIASSEN, R. Flagellar mutants in man: on the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome. *J. Ultrastr. Res.* 69:43-52 (1979).
4. ALLEN, T. D., SCARFFE, J. H., CROWTHER, D. Ultrastructural aspects of colchicine ultrasensitivity in CLL lymphocytes. *Blood Cells* 7:147-160 (1981).
5. ALLEN, R. D., TRAVIS, J. L., STROMGREN ALLEN, N., YILMAZ, H. Video-enhanced contrast polarization (AVECPOL) microscopy: a new method applied to the detection of birefringence in the motile reticulopodial network of *Allogramma laticollaris*. *Cell Motility* 1:275-289 (1981).
6. AMOS, L. A., BAKER, T. S. The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* 279:607-612 (1979).
7. ANDERSEN, B., OSBORN, M., WEBER, K. Specific visualization of the distribution of the calcium dependent regulatory protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase (modulator pro-

- tein) in tissue culture cells by immunofluorescence microscopy: mitosis and intercellular bridge. *Cytobiologie* 17:354-364 (1978).
8. ANTOINE, J. C., MAURICE, M., FELDMANN, G., AVRAMESS, S. In vivo and in vitro effects of colchicine and vinblastine on the secretory process of antibody-producing cells. *J. Immunol.* 125:1939-1949 (1980).
9. AUBIN, J. E., TOLSON, N., LING, V. The redistribution of fluoresceinated concanavalin A in Chinese hamster ovary cells and in their colcemid-resistant mutants. *Exp. Cell. Res.* 126:75-86 (1980).
10. BACETTI, B. Unusual features of insect spermatogenesis. In: *Int. Cell Biol.*, Brinckley, B. R., Porter, K. R., edit., Rockefeller Univ. Press, 580-587 (1977).
11. BAJER, A. Notes on ultrastructure and some properties of transport within the living mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 33:713-719 (1967).
12. BAKER, T. S., AMOS, L. A. Structure of the tubulin dimer in zinc-induced sheets. *J. molec. Biol.* 123:89-108 (1978).
13. BARCLAY, N. E. Marginal bands in duck and camel erythrocytes. *Anat. Record* 154:313 (1966).
14. BARNES, L. D., ROBERSON, G. M. Tubulin and microtubules from bovine kidney: purification, properties, and characterization of ligand binding. *Arch. Biochem.* 196:511-618 (1979).
15. BEHNKE, O., FORER, A. Evidence for four classes of microtubules in individual cells. *J. Cell Sci.* 2:169-192 (1967).
- 15a. BEHNKE, O. Microtubules in disk-shaped blood cells. *Intern. Rev. exp. Path.* 9:1-92 (1970).
16. BERGEN, L. G., BORISY, G. G. Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell Biol.* 84:141-150 (1980).
17. BERSHADSKY A. D., GELFAND, V. I., SVITKINA,

- T. P., TINT, I. S. Cold-stable microtubules in the cytoplasm of mouse embryo fibroblasts. *Cell Biol. intern. Rep.* 3:45-50 (1979).
18. BLACK, M. M., LASEK, R. J. Slow components of axonal transport. 2 Cytoskeletal networks. *J. Cell Biol.* 86:616-623 (1980).
19. BLOODGOOD, R. A. Biochemical analysis of axostyle motility. *Cytobios* 14:101-120 (1975).
20. BLOSE, S. H. 10-nanometer filaments and mitosis. Maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells. *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* 76:3372-3376 (1979).
21. BORENFREUND, E., HIGGINS, P. J., PETERSON, E. Intermediatesized filaments in cultured rat liver tumor cells with Mallory body-like cytoplasm abnormalities. *J. nat. Cancer Inst.* 64:323-334 (1980).
22. BRADY, S. T., CROTHERS, S. D., NOSAL, C., McCLURE, W. O. Fast axonal transport in the presence of high Ca^{2+} . Evidence that microtubules are not required. *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* 77:5909-5913 (1980).
23. BRIMJOIN, S., OLSEN, J., ROSENSEN, R. Comparison of the temperature dependence of rapid axonal transport and microtubules in nerve of the rabbit and bullfrog. *J. Physiol. (Lond.)* 287:303-314 (1979).
24. BRINKLEY, B. R., CARTWRIGHT, J., Jr. Cold-labile and cold-stable microtubules in the mitotic spindle of mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253:428-439 (1975).
25. BRINKLEY, B. R., COX, S. M., PEPPER, D. A., WIBLE, L., BRENNER, S. L., PARDUE, R. L. Tubulin assembly sites and the organization of cytoplasmic microtubules in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.* 90:554-562 (1981).
26. BRYAN, J. Vinblastine and microtubules. II. Characterization of two protein subunits from the isolated crystals. *J. molec. Biol.* 66:157-168 (1972).
27. BULINSKI, J. C., BORISY, G. G. Microtubule-associated proteins from cultured HeLa cells. Analysis of molecular properties and effects on microtubule polymerization. *J. Biol. Chem.* 255:11570-11576 (1980a).
28. BULINSKI, J. C., BORISY, G. G. Immunofluorescence localization of HeLa cell microtubule-associated proteins on microtubules in vitro and in vivo. *J. Cell. Biol.* 87:792-801 (1980b).
29. BULINSKI, J. C., BORISY, G. G. Widespread distribution of a 210,000 mol wt microtubule-associated protein in cells and tissues of primates. *J. Cell. Biol.* 87:802-808 (1980c).
30. BURKE, B. E., DELORENZO, R. J. Ca^{2+} stimulated and calmodulin-stimulated endogenous phosphorylation of neurotubulin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:991-995 (1981).
31. BURTON, P. R. Polymorphic assemblies of tubulin. Cell muscle motility 1:289-334 (1981).
32. BURTON, P. R., PAIGE, J. L. Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:3269-3273 (1981).
- 32a. BUSBY, C. H., GUNNING, B. Observations on pre-prophase bands of microtubules in uniseriate hairs, stomatal complexes of sugar cane, and *Cyperus* root meristems. *Europ. J. Cell Biol.* 21:214-223 (1980).
33. CACHON, J., CACHON, M. Les systèmes axopodiaux. *Année Biol.* 13:523-560 (1974).
34. CACHON, J., CACHON, M. Polymorphism of tubulin reassembly. 1. Different aspects of allotropic transformations induced by low temperature. *Biol. cell.* 37:23-34 (1980).
35. CHOU, I. N., ZEIGER, J., BLACK, P. H. Colchicine stimulation of plasminogen activator (PA) expression and DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *J. Cell. Biol.* 91:329a (1981).
36. CLEVELAND, D. W., KIRSCHNER, M. W. Examination of the genes coding for α - and β -tubulin. In: *Int. Cell Biol.*, Schweiger, H. G., edit., Springer Verlag, Berlin., 15-27 (1981).
37. CLEVELAND, D. W., LOPATA, M. A., MACDONALD, R. J., COWAN, N. J., RUTTER, W. J., KIRSCHNER, M. W. Number and evolutionary conservation of α - and β -tubulin and cytoplasmic β - and γ -actin genes using specific cloned cDNA probes. *Cell* 20:95-106 (1980).
38. CLEVELAND, D. W., SPIEGELMAN, B. M., KIRSCHNER, M. W. Conservation of microtubule associated proteins. Isolation and characterization of τ and the high molecular weight microtubule associated protein from chicken brain and from mouse fibroblasts and comparison to the corresponding mammalian brain proteins. *J. biol. Chem.* 254:12670-12678 (1979).
39. COHEN, W. D. On erythrocyte morphology. *Blood Cells* 4:449-451 (1978).
40. COHEN, W. D. Observations on the marginal band system of nucleated erythrocytes. *J. Cell Biol.* 78:260-273 (1978).
41. COHEN, W. D., NEMHAUSER, I. Association of centriole-like structures with the marginal band of a molluscan red cell. *Biol. Bull.* 157:363 (1979).
42. COHEN, W. D., NEMHAUSER, I. Association of centrioles with the marginal band of a molluscan erythrocyte. *J. Cell Biol.* 86:286-291 (1980).
43. COHEN, W. D., TERWILLIGER, N. B. Marginal bands in camel erythrocytes. *J. Cell. Sci.* 36:97-108 (1979).
44. COTE, R. H., BORISY, G. G. Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. *J. molec. Biol.* 150:577-598 (1981).
45. CREPEAU, R. H., McEWEN, B., EDELSTEIN, S. J. Differences in α and β -polypeptide chains of tubulin resolved by electron microscopy with image reconstruction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75:5006-5010 (1978).
46. CROSSIN, K. L., CARNEY, D. H. Microtubule stabilization by taxol inhibits growth factor-stimulated DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 91:334a (1981).
47. CROSSIN, K. L., CARNEY, D. H. Evidence that microtubule depolymerization early in the cell cycle is sufficient to initiate DNA synthesis.

- Cell. 23:61-72 (1981).
48. DAVIDSON, D. Colchicine stimulation of interphase cells: Timing the response using 5-aminouracil. *Cytologia* 44:633-638 (1979).
 49. DE BRABANDER, M., GEUENS, G., DE MEY, J., JONIAU, M. The organized assembly and function of the microtubule system throughout the cell cycle. In: *Cell Movement and Neoplasia*, De Brabander et al., edit., Pergamon Press, Oxford, New York, 29-40 (1980).
 50. DE BRABANDER, M., GEUENS, G., DE MEY, J., JONIAU, M. Nucleated assembly of mitotic microtubules in living PTK₂ cell after release from nocadazole treatment. *Cell motility* 1:469-484 (1981).
 51. DE BRABANDER, M., GEUENS, G., NYDENS, R., WILLEBORDS, R., DE MEY, J. The microtubule nucleating and organizing activity of kinetochores and centrosomes in living PTK₂-cells. In: *Microtubule and Microtubule Inhibitors*, De Brabander, De Mey, Edit., 255-268 (1980).
 52. DE BRABANDER, M., WANSON, J. C., MOSSELMANS, R., GEUENS, G., DROCHMANS, P. Effects of antimicrotubular compounds on monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Biol. Cell.* 31:127-140 (1978).
 53. DE MEY, J., MOEREMANS, M., GEUENS, G., NUYDENS, R., VAN BELLE, H., DE BRABANDER, M. Immunocytochemical evidence for the association of calmodulin with microtubules of the mitotic apparatus. In: *Microtubule and Microtubule Inhibitors* 1980, De Brabander and De Mey, Edit., Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
 54. DUERR, A., PALLAS, D., SOLOMON, F. Molecular analysis of cytoplasmic microtubules in situ: Identification of both widespread and specific proteins. *Cell* 24:203-212 (1981).
 55. DUSTIN, A. P. Contribution à l'étude des poisons caryoclasiques sur les tumeurs animales. II. Action de la colchicine sur le sarcome greffé, type Crocker, de la souris. *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.* 14:487-502 (1934).
 56. DUSTIN, A. P., HAVAS, L., LITS, F. Action de la colchicine sur les divisions cellulaires chez les végétaux. *C. R. Ass. anat.* 32:170-176 (1937).
 - 56a. DUSTIN, A. P. Recherches sur le mode d'action des poisons stathmocinétiques. Action de la colchicine sur l'utérus de lapine impubère sensibilisé par l'injection préalable d'urine de femme enceinte. *Arc. Biol. (Liège)* 54:111-187 (1943).
 57. DUSTIN, P. Microtubules and hormone secretion. IV. *Europ. Symp. On hormone and cell regulation.* (sous presse).
 58. DUSTIN, P. *Microtubules.* Springer Verlag, Berlin. 1-452 (1978).
 59. DUSTIN, P. Microtubules et mitose. *Bull. Ass. Anatom.* 63:109-126 (1979).
 60. EDA, T., KANDA, Y., MORI, C., KIMURA, S. Core-like and microtubular structures in a stable L-form of *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* 23:915-920 (1979).
 61. EDSTRÖM A., HANSON, M., WALLIN, M., CEDERHOLM, B. Inhibition of fast axonal transport and microtubule polymerization in vitro by colchicine and colchicineine. *Acta. physiol. scand.* 107:233-238 (1979).
 62. EIGSTI, O. J., DUSTIN, P. Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Iowa State College Press, Ames, Iowa. (1955).
 63. EUTENEUER, U., MCINTOSH, R. Structural polarity of kinetochore microtubules in PTK₁ cells. *J. Cell Biol.* 89:338-345 (1981).
 64. FARRELL, K. W., WILSON, L. Microtubule reassembly in vitro of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm tail outer doublet tubulin. *J. Molec. Biol.* 121:393-410 (1978).
 65. FLAMENT-DURAND, J., DUSTIN, P. Studies on the transport of secretory granules in the magnocellular hypothalamic neurons. I. Action of colchicine on axonal flow and neurotubules in the paraventricular nuclei. *Z. Zellforsch.* 130:440-454 (1972).
 66. FORER, A. Characterization of the mitotic traction system, and evidence that birefringent spindle fibers neither produce nor transmit force for chromosome movement. *Chromosoma* 19:44-98 (1966).
 67. FORER, A., JACKSON, W. T., ENGBERG, A. Actin in spindles of *Haemantus catherinae*. I. General results using various glycerination methods. II. Distribution of actin in chromosomal spindle fibres, determined by analysis of serial sections. *J. Cell Biol.* 37:323-348; 349-372 (1979).
 68. FRANKE, W. W., GRUND, C., OSBORN, M., WEBER, K. Intermediate-sized filaments in rat kangaroo PtK₂ cells. 1. Morphology in situ. *Cytobiologie* 17:365-391 (1978).
 69. FRANKE, W. W., SCHMID, E., OSBORN, M., WEBER, K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 75:5034-5038 (1978).
 70. FRANKE, W. W., SCHMID, E., OSBORN, M., WEBER, K. Intermediate-sized filaments in rat kangaroo PtK₂ cells. 2. Structure and composition of isolated filaments. *Cytobiologie* 17:392-411 (1978).
 71. FRANKE, W. W., SCHMID, E., OSBORN, M., WEBER, K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 81:570-580 (1979).
 72. FRANKE, W. W., SCHMID, E., WEBER, K., OSBORN, M. Hela cells contain intermediate-sized filaments of the prekeratin type. *Exp. Cell Res.* 118:95-110 (1979).
 73. FRIEDMAN, P. A., PLATZER, E. G. Interaction of antihelminthic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochim. Biophys. Acta* 544:605-614 (1978).
 74. FUJIWARA, K., POLLARD, T. D. Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm cleavage furrow, and mitotic spindle of human cells. *J. Cell Biol.* 71:848-875 (1976).
 75. GALATIS, B., MITRAKOS, K. On the differential divisions and preprophase microtubule bands

- in the development of stomata of *Vigna sinensis*. *L. J. Cell Sci.* 37:11-38 (1979).
76. GEIGER, B., SINGER, S. J. Association of microtubules and intermediate filaments in chicken gizzard cells as detected by double immunofluorescence. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 77:4769-4773 (1980).
 77. GONIAKOWSKA-WITALINSKA, L., WITALINSKA, W. Evidence for a correlation between the number of marginal band microtubules and the size of vertebrate erythrocytes. *J. Cell Sci.* 22:397-402 (1976).
 78. GRAFSTEIN, B., FORMAN, D. S. Intracellular transport in neurons. *Physiol. Rev.* 60:1167-1283 (1980).
 79. HAMEL, E., DEL CAMPO, A. A., LOWE, M. C., LIN, C. M. Interactions of taxol, microtubule-associated proteins and guanine nucleotides in tubulin polymerization. *J. Biol. Chem.* 256:11887-11894 (1981).
 80. HANDEL, M. A. Effects of colchicine on spermiogenesis in the mouse. *J. Embryol. exp. Morph.* 51:73-83 (1979).
 81. HARDHAM, A. R., GUNNING, B. E. S. Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *J. Cell Biol.* 77:14-34 (1978).
 82. HARDHAM, A. R., GUNNING, B. E. S. Interpolation of microtubules into cortical arrays during cell elongation and differentiation in roots of *Azolla pinnata*. *J. Cell Sci.* 37:411-442 (1979).
 83. HEBERT, C. D., STEFFENS, W. L., WILLE, J. J. Jr. The role of spindle microtubule assembly in the control of mitotic timing in *Physarum*. Induction of a novel type of tubular structure by griseofulvin treatment. *Exp. Cell Res.* 126:1-14 (1980).
 84. HEIDEMANN, S. R., LANDERS, J. M., HAMBORG, M. A. Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* 9:661-665 (1981).
 85. HEIDEMANN, S. R., McINTOSH, J. R. Visualization of the structural polarity of microtubules. *Nature* 286:517-519 (1980).
 86. HEIDEMANN, S. R., ZIEVE, G. W., McINTOSH, J. R. Evidence for microtubule subunit addition to the distal end of mitotic structures in vitro. *J. Cell Biol.* 87:152-159 (1980).
 87. HEPLER, P. K. Membranes in the mitotic apparatus of Barley cells. *J. Cell Biol.* 86:490-499 (1980).
 88. HERMAN, B., ALBERTINI, D. F. Mechanism of action of taxol on the random or nucleated assembly of microtubules in vitro. *J. Cell Biol.* 91:338a (1981).
 89. HERMAN, I. M., POLLARD, T. D. Comparison of purified anti-actin and fluorescent-heavy meromyosin staining patterns of dividing cells. *J. Cell Biol.* 80:509-520 (1979).
 90. HEUSELE, C., CARLIER, M. F. GTPase activity of the tubulin colchicine in relation with tubulin-tubulin interactions. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 103:332-338 (1981).
 91. HIMES, R. H., KERSEY, R. N., HELLER-BETTINGER, I. Action of the Vinca alkaloids vincristine, vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro. *Cancer Res.* 36:3798-3802 (1976).
 92. HINKLEY, R. E., Jr. Microtubule-macro tubule transformations induced by volatile anesthetics. Mechanism of microtubule assembly. *J. Ultrastruct. Res.* 57:237-250 (1976).
 93. HINKLEY, R. E., SAMSON, F. E. Anesthetic-induced transformation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* 53:258-263 (1972).
 94. HORWITZ, B., KUPFER, H., ESHHAR, Z., GEIGER, B. Reorganization during mitosis. Immunofluorescence microscopy with monoclonal and monoclonal prekeratin antibodies. *Exp. Cell Res.* 134:281-290 (1981).
 95. HOWELL, J. T., SCHOCHET, S. S., Jr., GOLDMAN, A. S. Ultrastructural defects of respiratory tract cilia associated with chronic infections. *Arch. Path. Lab. Med.* 104:52-55 (1980).
 96. HUANG, B., PIPERNO, G., LUCK, D. J. L. Paralyzed flagella mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Defective for axonemal doublet microtubule arms. *J. biol. Chem.* 254:3091-3099 (1979).
 97. IRELAND, C. M., GULL, K., GUTTERIDGE, W. E., POGSON, C. I. The interaction of benzimidazole carbamates with mammalian microtubule protein. *Biochem. Pharmacol.* 28:2680-2681 (1979).
 98. IZANT, J. G., McINTOSH, J. R. Microtubule-associated proteins. A monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77:4741-4745 (1980).
 99. JACOBS, M. Tubulin and nucleotides. In: Roberts, K., Hyams, J. S. (Edit.): *Microtubules*. Academic Press, London. 255-277 (1979).
 100. JACOBS, M., CAVALIER-SMITH, T. Mitosis and microtubule assembly. *Biochem. Soc. Symp.* 42:193-219 (1977).
 101. JAMIESON, B. G. M., DADDOW, L. An ultrastructural study of microtubules and the acrosome in spermiogenesis of tubificidae (oligochaeta). *J. Ultrastr. Res.* 67:209-224 (1979).
 102. JOB, D., FISHER, E. H., MARGOLIS, R. L. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:4679-4682 (1981).
 103. JOHNSON, K. A., BORISY, G. G. Kinetic analysis of microtubule self-assembly in vitro. *J. molec. Biol.* 117:1-32 (1977).
 104. JONES, J. C. R., TUCKER, J. B. Microtubule-organizing centres and assembly of the double-spiral microtubule pattern in certain heliozoan axonemes. *J. Cell. Sci.* 50:259-280 (1981).
 105. KAKIUCHI, S., SOBUE, K. Ca^{2+} - and calmodulin-dependent flip/flop mechanism in microtubule assembly-disassembly. *FEBS lett.* 132:141-143 (1981).
 106. KARR, T. L., KRISTOFFERSON, D., PURICH, D. L. Mechanism of microtubule depolymerization. Correlation of rapid induced disassembly experiments with a kinetic model for endwise depolymerization. *J. biol. Chem.* 255:8560-8566 (1980).
 107. KARR, T. L., PURICH, D. L. A microtubule as-

- sembly/disassembly model based on drug effects and depolymerization kinetics after rapid dilution. *J. biol. Chem.* 254:10885-10888 (1979).
108. KIMOFF, R. J., HUANG, S. N. Immunocytochemical and immunoelectron microscopic studies on Mallory bodies. *Lab. Invest.* 45:491-503 (1981).
 109. KIRSCHNER, M. W. Microtubule assembly and nucleation. *Int. Rev. Cytol.* 54:1-71 (1978).
 110. KIRSCHNER, M. W. Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo. *J. Cell Biol.* 86:330-334 (1980).
 111. KIRSCHNER, M. W., WILLIAMS, R. C., WEINGARTEN, M., GERHART, J. C. Microtubules from mammalian brain: some properties of their depolymerization products and a proposed mechanism of assembly and disassembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71:1159-1187 (1974).
 112. KLEE, C. B., CROUCH, T. H., RICHMAN, P. G. Calmodulin. *Ann. Rev. Biochem.* 49:489-516 (1980).
 113. KUZNETSOV, S. A., RODIONOV, V. I., BERSHADSKY, A. D., GELFAND, V. I., ROSENBLAT, V. A. High molecular weight protein map2 promoting microtubules assembly in vitro is associated with microtubules in cells. *Cell Biol. Intern. Rep.* 4:1017-1024 (1980).
 114. LEDBETTER, M. C., PORTER, K. R. A "microtubule" in plant fine structure. *J. Cell Biol.* 19:239-250 (1963).
 115. LIN, CHII, M., HAMER, E., WOLPERT-DEFILIPES, MARY, K. Binding of maytansine to tubulin: competition with mitotic inhibitors. *Chem. Pathol. Pharmacol.* 37:443-452 (1981).
 116. LITS, F. J. Recherches sur les réactions et lésions cellulaires provoquées par la colchicine. *Arch. intern. Méd. exp.* 11:811-901 (1936).
 117. LOCKWOOD, A. H. Tubulin assembly protein: immunochemical and immunofluorescent studies on its function and distribution in microtubules and cultured cells. *Cell* 13:613-628 (1978).
 118. LUDUENA, R. F. Biochemistry of tubulin. In: Roberts, K., Hyams (Edit.): *Microtubules*. Academic Press. 65-116 (1979).
 119. LUDUENA, R. F., WOODWARD, D. O. Isolation and partial characterization of α - and β -tubulin from outer doublets of sea-urchin sperm and microtubules of chick-embryo brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70:3594-3598 (1973).
 120. McCULLY, E. K., ROBINOW, C. F. Mitosis in heterobasidiomycetous yeasts. I. *Leucosporidium scottii* (candida scottii). II. *Rhodospiridium* sp. (*Rhodotorula glutinis*) and *Aessosporon salmonicolor* (*Sporobolomyces salmonicolor*). *J. Cell Sci.* 10:857-881; 11:1-31 (1972).
 121. McINTOSH, J. R. (1979). Cell division. In: Roberts, K., Hyams, J. S. (Edit.): *Microtubules*. Academic Press, London. 381-441 (1979).
 122. McINTOSH, J. R. Microtubule polarity and interaction in mitotic spindle function. In: *Int. Cell Biol.*, Schweiger, H. G. (Edit.) Springer Verlag, Berlin. 359-368 (1981).
 123. McINTOSH, J. R., EUTENEUER, U., NEIGHBORS, B. Intrinsic polarity as a factor in microtubule function. In: *Microtubules and microtubule inhibitors 1980*, De Brabander, M., De Mey, J. (Edit.), Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford (1980).
 124. McINTOSH, J. R., PORTER, K. R. Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *J. Cell Biol.* 35: 153-173 (1967).
 125. MACCIONI, R. B., MELLADO, W. Characteristics of the in vitro assembly of brain tubulin of *Cyprinus carpio*. *Com. Biochem. Physiol. PTB* 70:375-380 (1981).
 126. MacNEAL, R. K., PURICH, D. L. Chromium (III) -nucleotide complexes as probes of the guanosine 5'-triphosphate-induced microtubule assembly. *Arch. Biochem. Biophys.* 191:233-297 (1978).
 127. MALAISSE-LAGAE, F., AMHERDT, M., RAVAZZOLA, M., SENER, A., HUTTON, J. C., ORCI, L., MALAISSE, W. J. Role of microtubules in the synthesis conversion, and release of (pro) insulin Biochemical and radioautographic study in rat islets. *J. clin. Invest.* 63:1284-1296 (1979).
 128. MANDELKOW, E. M., MANDELKOW, E., SCHULTHEISS, R. Correlation between structural polarity and polar assembly of brain tubulin. *J. molec. Biol.* 134:293-300 (1979).
 129. MARCUM, J. M., DEDMAN, J. R., BRINKLEY, B. R., MEANS, A. R. Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75:3771-3775 (1978).
 130. MARGOLIS, R. L., RAUCH, CH. T. Characterization of rat brain crude extract microtubule assembly: correlation of cold stability with the phosphorylation state of a microtubule-associated 64K protein. *Biochemistry* 20:4451-4457 (1981).
 131. MARGOLIS, R. L., WILSON, L. Addition of colchicine-tubulin complex to microtubule ends. Mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:3466-3470 (1977).
 132. MARGOLIS, R. L., WILSON, L., KIEFER, B. I. Mitotic mechanism based on intrinsic microtubule behaviour. *Nature* 272:450-451 (1978).
 133. MARGULIS, L., TO, L., CHASE, D. Microtubules in prokaryocytes. *Science* 200: 1118-1123 (1978).
 134. MATSUMURA, F., HAYASHI, M. Polymorphism of tubulin assembly. In vitro formation of sheet, twisted ribbon and microtubule. *Biochim. biophys. Acta* 453:162-175 (1976).
 135. MATUS, A., BERNHARDT, R., HUGHJONES, T. High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:3010-3014 (1981).
 136. MELLON, M. G., REBHUN, L. I. Sulfhydryls and in vitro polymerization of tubulin. *J. Cell Biol.* 70:226-238 (1976).

137. METTLER, N. R., GRAY, M. E., SCHUFFMAN, S., LEQUIRE, V. S. β -adrenergic induced synthesis and secretion of phosphatidylcholine by isolated pulmonary alveolar type II cells. *Lab. Invest.* 45:575-586 (1981).
138. MORGENSTERN, E., JANZARIK, H. Microtubular cytoskeleton in avian thrombocytes and human blood platelets and its correlations to certain organelles. *Mikroskopie* 33:47-57 (1977).
139. MURPHY, D. B., TILNEY, L. G. The role of microtubules in the movement of pigment granules in teleost melanophores. *J. Cell Biol.* 61:757-779 (1974).
140. NACHMIAS, V. T. Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J. Cell Biol.* 86:795-802 (1980).
141. NICKERSON, S. C. SMITH, J. J., KEENAN, T. W. Role of microtubules in milk secretion. Action of colchicine on microtubules and exocytosis of secretory vesicles in rat mammary epithelial cells. *Cell Tiss. Res.* 207:361-376 (1980).
142. OCHS, S. Calcium requirement for axoplasmic transport and the role of the perineural sheath. In: *Nerve repair and regeneration: its clinical and experimental basis*. Jewett, D. L., McCarroll, H. R. (Edit.) Mosby, C. V. Co. St. Louis. 77-89 (1980).
143. OCHS, S., WORTH, R. M. Axoplasmic transport in normal and pathological systems. In: *Waxman, S. G. (Edit.): Physiology and pathobiology of axons*, Raven Press, New York, 251-264 (1978).
144. OSBORN, M., FRANKE, W. W., WEBER, K. Direct demonstration of the presence of two immunologically distinct intermediatesized filament systems in the same cell by double immunofluorescence microscopy. Vimentin and cytokeratin fibers in cultured epithelial cells. *Exp. Cell. Res.* 125:37-46 (1980).
145. OTTO, A. M., ULRICH, M. O., ZUMBE, A., DEASUA, L. J. Microtubuledisrupting events regulating the initiation of DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:3063-3067 (1981).
146. PARISH, D. C., RODRIGUEZ, E. M., BIRKETT, S. D., PICKERING, B. T. Effects of small doses of colchicine on the components of the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Cell Tiss. Res.* 220:809-828 (1981).
147. PAWELETZ, N., FINZE, E. M. Membranes and microtubules of the mitotic apparatus of mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 76:127-133 (1981).
148. PENNINGROTH, S. M. Colchicine binding to an oligomer of tubulin. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 92:183-190 (1980).
149. PENNINGROTH, S. M., CLEVELAND, D. W., KIRSCHNER, M. W. In vitro studies of the regulation of microtubule assembly. In: *Cell Motility*. Goldman, R., Pollard, T., Rosenbaum, J. (Edit.) Cold Spring Harbor Lab. (1976).
150. PIEZZI, R. S., CAVICCHIA, J. C. Effects of cold and melatonin on the microtubules of the toad sciatic nerve. *Anatom. Rec.* 200:115-120 (1981).
151. PITON, R. Recherches sur les actions caryoclastiques et caryocinétiques des composés arsenicaux. *Arch. intern. Méd. exp.* 5:355-411 (1929).
152. PONSTINGL, H., LITTLE, M., KRAUHS, E., KEMPF, T. Carboxy-terminal amino acid sequence of α -tubulin from porcine brain. *Nature* 282:423 (1979).
153. PORTER, K. R. Microtubules in intracellular locomotion. *Locomotion of Tissue Cells*. Ciba Found. Symp. Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam. 14:149-170 (1973).
154. POWELL, A. J., LLOYD, C. W., SLABAS, A. R., COVE, D. J. Demonstration of the microtubular cytoskeleton of the moss, *Physcomitrella patens*, using antibodies against mammalian brain tubulin. *Plant. Sci. Lett.* 18:401-404 (1980).
155. PRATT, M. M., OTTER, T., SALMON, E. D. Dynein-like Mg^{2+} -ATPase in mitotic spindles isolated from sea urchin embryos (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *J. Cell Biol.* 86:738-745 (1980).
156. PRESTON, S. F., DEANIN, G. G., HANSON, R. K., GORDON, M. W. The phylogenetic distribution of tubulin: tyrosine ligase. *J. molec. Evol.* 13:233-244 (1979).
157. RAFF, E. C. Control of microtubule assembly in vivo. *Intern. Rev. Cyto.* 59:1-96 (1979).
158. RAYBIN, D., FLAVIN, M. Modification of tubulin by tyrosylation in cells and extracts and its effect on assembly in vitro. *J. Cell Biol.* 73:492-504 (1977).
159. REBHUN, L. I., JEMIOLO, D., KELLER, T., BURGESS, W., KRETSINGER, R. Calcium calmodulin and control of assembly of brain and spindle microtubules. In: *Microtubules and microtubule inhibitors 1980*, De Brabander, M., De Mey, J. (Edit.) Elsevier North Holland Biomedical Press., Amsterdam, New York, Oxford. 243-254 (1980).
160. RIS, H., KUBAI, D. F. An unusual mitotic mechanism in the parasitic protozoan *Syndinium* sp. *J. Cell Biol.* 60:702-720 (1974).
161. RIS, H., WITT, P. L. Structure of the mammalian kinetochore. *Chromosoma* 82:153-170 (1981).
162. ROBERTS, K., HYAMS, J. S. (Edit.). *Microtubules*. Academic Press, London (1979).
163. ROBINSON, D. G. Structure, synthesis and orientation of microfibrils. 3. Survey of action of microtubule inhibitors on microtubules and microfibril orientation in oocystis solitaria. *Cytobiologie* 15:463-474 (1977).
164. ROOBOL, A., GULL, K., POGSON, C. I. Evidence that griseofulvin binds to a microtubule associated protein. *FEBS lett.* 75:149-153 (1977).
165. RUNGE, M. S., DETRICH, H. W., WILLIAMS, R. C., Jr. Identification of the major 68 000-dalton protein of microtubule preparations as a 10-nm filament protein and its effects on microtubule assembly in vitro. *Biochemistry* 18:1689-1697 (1979).

166. SANDOVAL, I. V., WEBER, K. Guanosine 5'-(α , β -methylene) triphosphate enhances specifically microtubule nucleation and stops the treadmill of tubulin protomers. *J. biol. Chem.* 255:6966-6974 (1980).
167. SATAKE, M., EBINA, T., ISHIDA, N. Effect of neocarzinostatin on microtubules. *Gann* 70:545-548 (1979).
- 167a. SATIR, P. The present status of the sliding microtubule model of ciliary motion. In: *Cilia and Flagella*, M. A. Sleight, Edit., London, New York, Academic Press, 131-142 (1974).
168. SCHIFF, P. B., FANT, J., HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277:665-667 (1979).
169. SCHIFF, P. B., HORWITZ, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77:1561-1565 (1980).
170. SCHLIWA, M. The role of divalent cations in the regulation of microtubule assembly. In vivo studies on microtubules of the heliozoan axopodium using the ionophore 123187. *J. Cell Biol.* 70:527-540 (1976).
171. SCHLIWA, M., EUTENEUER, U. A microtubule-independent component may be involved in granule transport in pigment cells. *Nature* 273:556-557 (1978).
172. SCHLIWA, M., EUTENEUER, U. Quantitative analysis of the microtubule system in isolated fish melanophores. *J. Supramol. Struct.* 8:177-190 (1978).
173. SCHLIWA, M., EUTENEUER, U., BULINSKI, J. C., IZANT, J. G. Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:1037-1041 (1981).
174. SCHLIWA, M., OSBORN, M., WEBER, K. Microtubule system of isolated fish melanophores as revealed by immunofluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 76:229-236 (1978).
175. SCHLIWA, M., VAN BLERKOM, J. Structural interaction of cytoskeletal components. *J. Cell Biol.* 90:222-235 (1981).
176. SCHLIWA, M., WEBER, K., PORTER, K. R. Localization and organization of actin in melanophores. *Cell Biol.* 89:267-275 (1981).
177. SCHÖNHARTING, M., BREER, H., RAHMANN, H., SIEBERT, G., ROSNER, H. Colchicine, a novel inhibitor of fast axonal transport without tubulin binding properties. *Cytobiologie* 16:106-117 (1977).
178. SCHREK, R., STEFANI, S. S. Toxicity of microtubular drugs to leukemic lymphocytes. *Exp. molec. Path.* 34:369-378 (1981).
179. SCHWAB, M. E., SUDA, K., THOENEN, H. Selective retrograde transsynaptic transfer of protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. *J. Cell Biol.* 82:798-810 (1979).
180. SCHWARTZ, J. H. Axonal transport: components, mechanisms, and specificity. *Ann. Rev. Neurosci.* 2:467-504 (1979).
181. SHETERLINE, P. Immunological characterisation of the microtubule-associated protein MAP2. *FEBS lett.* 111:167-170 (1980).
182. SILVER, R. B., COLE, R. D., CANDE, W. Z. Isolation of mitotic apparatus containing vesicles with calcium sequestration activity. *Cell* 19:505-516 (1980).
183. SLAUTTERBACK, D. B. Cytoplasmic microtubules. I. Hydra. *J. Cell Biol.* 18:367-388 (1963).
184. SLOBODA, R. D., DENTLER, W. L., BLOODGODD, R. A., TEIZER, B. R., GRANETTE, S., ROSENBAUM, J. L. Microtubule-associated proteins (MAPs) and the assembly of microtubules in vitro. In: *Cell motility*. Goldman, R., Pollard T., Rosenbaum, J. (Edit.) Cold Spring Harbor Lab. 1171-1212 (1976).
185. SLOBODA, R. D., DENTLER, W. L., ROSENBAUM, J. L. Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry* 15:4497-4505 (1976).
186. SLOBODA, R. D., DICKERSIN, K. Structure and composition of the cytoskeleton of nucleated erythrocytes. I. The presence of microtubule-associated protein 2 in the marginal band. *J. Cell Biol.* 87:170-179 (1980).
187. SOBUE, K., FUJITA, M., MURAMOTO, Y., KAKIUCHI, S. The calmodulin-binding protein in microtubules is TAU factor. *FEBS lett.* 132:137-140 (1981).
188. STARLING, D. Two ultrastructurally distinct tubulin paracrystals induced in sea-urchin eggs by vinblastine sulphate. *J. Cell Sci.* 20:79-90 (1976).
189. STEARNS, M. E. Lattice-dependent regulations of axonal transport by calcium ions. In: *Microtubules and microtubule inhibitors 1980*. De Brabander, M., De Mey, J. (Edit.) Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford. (1980).
190. STEINER, M., IKEDA, Y. Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules: changes caused by aggregating agents. *J. clin. Invest.* 63:443-448 (1979).
191. SUSAKI, T., SHIGENAKA, Y., WATANABE, S., TOYOHARA, A. Food capture and ingestion in the large Heliozoan, *Echinospaerium nucleofilum*. *J. Cell Sci.* 42:61-79 (1980).
192. SUTHANTHIRAN, M., STENZEL, K. H., RUBIN, A. L., NOVOGRADESKY, A. Augmentation of proliferation and generation of specific cytotoxic cells in human mixed lymphocyte culture reactions by colchicine. *Cell. Immunol.* 50:379-391 (1980).
193. TAMM, L. K., CREPEAU, R. H., EDELSTEIN, S. J. Three-dimensional reconstruction of tubulin in zinc-induced sheets. *J. molec. Biol.* 130:473-492 (1979).
194. TAN, L. P., NG, M. L., KUMAR DAS, V. G. The effect of trialkyltin compounds on tubulin polymerization. *J. Neurochem.* 31:1035-1042 (1978).
195. TAYLOR, E. W. The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H³-colchicine. *J. Cell Biol.* 25:145-160 (1965).
196. TELZER, B. R., HAIMO, L. T. Decoration of

- spindle microtubules with dynein: evidence for uniform polarity. *J. Cell Biol.* 89:373-378 (1981).
197. TELZER, B. R., ROSENBAUM, J. L. Cell cycle-dependent, in vitro assembly of microtubules onto the pericentriolar material of HeLa cells. *J. Cell Biol.* 81:484-488 (1979).
 198. TENG, M. H., BARTHOLOMEW, J. C., BISSELL, M. J. Synergism between anti-microtubule agents and growth stimulants in enhancement of cell cycle traverse. *Nature* 268:739-740 (1977).
 199. THOMPSON, W. C., PURICH, D. L., WILSON, L. Taxol slows microtubule "treadmilling" in vitro. *J. Cell Biol.* 91:329a (1981a).
 200. THOMPSON, W. C., WILSON, L., PURICH, D. L. Taxol induces microtubule assembly at low temperature. *Cell Motility* 1:445-454 (1981b).
 201. TILNEY, L. G., PORTER, K. R. Studies on the microtubules in *Heliozoa*. II. The effect of low temperature on these structures in the formation and maintenance of the axopodia. *J. Cell Biol.* 34:327-343 (1967).
 202. TIMASHEFF, S. N., GRISHAM, L. M. In vitro assembly of cytoplasmic microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 49:565-592 (1980).
 203. TIPPIT, D. H., PICHETTEAS, J. D., LESLIE, R. Cell division in 2 large Pennate diatoms *Hantzschia* and *Nitzschia*. 3. A new proposal for kinetochore function during prometaphase. *J. Cell Biol.* 86:402-416 (1980).
 204. TRAVIS, J. L., ALLEN, R. D. Studies on the motility of the Foraminifera. I. Ultrastructure of the reticulopodial network of *Allogromia latifollis* (Arnold). *J. Cell Biol.* 90:211-221 (1981).
 205. TSUKITA, S., ISHIKAWA, H. The cytoskeleton in myelinated axons: serial section study. *Biomed. Res.* 2:424-437 (1981).
 206. VALLEE, R. B., DIBARTOLOMEIS, M. J., THEURKAUF, W. E. A protein kinase bound to the projection portion of MAP2 (microtubules-associated protein 2). *J. Cell Biol.* 90:568-576 (1981).
 207. VILLASANTE, A., DELA TORRE, J., MANSO-MARTINEZ, R., AVILA, J. Microtubule-associated protein MAP1 is not implicated in the polymerization of microtubules. *Europ. J. Biochem.* 112:611-616 (1980).
 208. WARNER, F. D., MITCHELL, D. R. Polarity of dynein-microtubule interactions in vitro. Cross-bridging between parallel and antiparallel microtubules. *Cell Biol.* 89:35-44 (1981).
 209. WEBB, B. C., WILSON, L. Cold-stable microtubules from brain. *Biochemistry* 19:1993-2000 (1980).
 210. WEHLAND, J., HERZOG, W., WEBER, K. Interaction of griseofulvin with microtubules, microtubule protein and tubulin. *J. molec. Biol.* 111:329-342 (1977).
 211. WEISENBERG, R. C. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177:1104-1105 (1972).
 212. WEISENBERG, R. C. Role of Co-operative interactions, microtubule-associated proteins and guanosine triphosphate in microtubule assembly: a model. *J. molec. Biol.* 139:660-678 (1980).
 213. WEISENBERG, R. C., BORISY, G. G., TAYLOR, E. W. The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* 7:4466-4478 (1968).
 214. WEISS, P. A. Neuronal dynamics and neuroplasmic ("axonal") flow. In: Barondes, S. H. (Edit.): *Cellular dynamics of the neuron*, Academic Press, New York, London. 3-34 (1969).
 215. WELSH, M. J., DEDMAN, J. H., BRINKLEY, B. R., MEAN, A. R. Calcium-dependent regulator protein: localization in mitotic apparatus of eukaryotic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:1867-1871 (1978).
 216. WICK, S. M., HEPLER, P. K. Localization of Ca^{++} -containing antimonate precipitates during mitosis. *J. Cell Biol.* 86:500-513 (1980).
 217. WICK, S. M., SEAGULL, R. W., OSBORN, M., WEBER, K., GUNNING, B. E. S. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. *J. Cell Biol.* 89:685-690 (1981).
 218. WILLARD, M., SIMON, C. Antibody decoration of neurofilaments. *Cell Biol.* 89:198-205 (1981).
 219. WILSON, L., ANDERSON, K., CHIN, D. Nonstoichiometric poisoning of microtubule polymerization: A model for the mechanism of action of the Vinca alkaloids, podophyllotoxin and colchicine. In: *Cell Motility*, Goldman, R., Pollard, T., Rosenbaum, J. (Edit.) Cold Spring Harbor Lab. 1051-1064 (1976).
 220. WISNIEWSKI, H., TERRY, R. D., SHELANSKI, M. L. Neurofibrillary degeneration of nerve cells after subarachnoid injection of mitotic spindle inhibitors. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 28:168-169 (1969).
 221. WITT, P. L., RIS, H., BORISY, G. G. Origin of kinetochore microtubules in Chinese hamster ovary cells. *Chromosoma* 81:483-505 (1980).
 222. WOLNIAK, S. M., HEPLER, P. K., JACKSON, W. T. Detection of the membrane-calcium distribution during mitosis in *Haemaphysalis* endosperm with chlorotetracycline. *J. Cell Biol.* 87:23-32 (1980).
 223. WOLOSEWICK, J. J., PORTER, K. R. Microtubular lattice of the cytoplasmic ground substance. *J. Cell Biol.* 82:114-139 (1979).
 224. YAMADA, Y. M., WESSELS, N. K. Axon elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. *Exp. Cell Res.* 66:346-352 (1971).
 225. ZAVALA, F., GUENARD, D., ROBIN, J. P., BROWN, E. Structure-antitubulin activity relationships in Steganacin congeners and analogues. Inhibition of tubulin polymerization in vitro by ($\pm$)-isodoxypodophyllotoxin. *J. med. Chem.* 23:546-548 (1980).
 226. ZIEVE, G. W., MCINTOSH, J. R. A. A probe for flagellar dynein in the mammalian mitotic apparatus. *J. Cell Sci.* 48:241-258 (1981).