



**HAL**  
open science

# ETUDE CINEMATIQUE ET FONCTIONNELLE DU CENTROSOME DESCELLULES DE VERTEBRE

Matthieu Piel

► **To cite this version:**

Matthieu Piel. ETUDE CINEMATIQUE ET FONCTIONNELLE DU CENTROSOME DESCELLULES DE VERTEBRE. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2001. Français. NNT: . tel-00012067

**HAL Id: tel-00012067**

**<https://theses.hal.science/tel-00012067>**

Submitted on 30 Mar 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS 6**

Spécialité :

Biologie Cellulaire

présentée

par M. Matthieu PIEL

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse :

**ETUDE CINEMATIQUE ET FONCTIONNELLE DU CENTROSOME DES  
CELLULES DE VERTEBRE**

soutenue le 14 novembre 2001

devant le jury composé de :

M. Philippe DENOULET	Président
M. Didier JOB	Rapporteur
M. Greenfield SLUDER	Rapporteur
M. Jacques PROST	Examineur
M. Michel BORNENS	Examineur



Remarque sur ma conception de l'objet du mémoire de thèse et remerciements :

*Je me suis longtemps demandé à qui je m'adressais en écrivant ce mémoire dont le contenu scientifique sera périmé avant que quiconque ait pu s'y intéresser. J'ai finalement décidé qu'il s'adresserait à moi, dans le sens où il constituerait une sorte de 'sauvegarde' des idées que j'ai pu me faire sur le centrosome au cours de mes quatre années de thèse. Il y aura donc deux lignes directrices : définir (c'est le sens de la science) et se souvenir (un mémoire/la mémoire). Cela signifie faire le point et consigner les idées avec le raisonnement qui m'a guidé.*

*Je ne me suis pas imposé de limite de taille et je m'excuse pour les membres du jury qui seront les seuls à se sentir jamais obligé de lire (presque) intégralement ce mémoire. Quant à moi, comme je ne considère pas que j'ai écrit ce mémoire pour eux en particulier, je ne me sens pas coupable et je ne leur en voudrais pas de juger ce travail sur une lecture partielle qui satisferait leur curiosité personnelle.*

*Je les remercie d'avoir accepté de participer à mon jury. Je remercie aussi tous les gens au milieu desquels je vis que ce soit pour mon travail ou en dehors et je ne vais pas en faire une classification. Ce travail n'est dédié à personne - ce ne serait pas un cadeau - et si je devais dédier quelque chose, je dédierais plutôt un poème que cette 'monstruosité vague' que constitue le mémoire de thèse.*

*Je voudrais tout de même remercier particulièrement Michel Bornens. J'ai effectué mon travail de thèse dans son laboratoire et il a toujours été disponible pour m'aider à combler mes lacunes en biologie, sans me juger trop sévèrement pour ma naïveté et en acceptant souvent de se laisser entraîner dans des digressions pour satisfaire ma curiosité ou pour le simple goût de la discussion et du débat d'idées, goût que nous partageons et qui n'a pas toujours simplifié les épreuves que constitue la rédaction des papiers. Toujours sur le plan du travail, je voudrais remercier tout particulièrement Conly Rieder, Alexey Khodjakov, Ursula Euteneuer, Véronique Chevrier, Didier Job, Jan de Mey et Jean Baptiste Sibarita qui, en plus d'être des collaborateurs compétents et patients dont j'ai beaucoup appris, sont des gens fort sympathiques.*



# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME .....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>10</b>
<b>I. AVANT PROPOS :.....</b>	<b>11</b>
<b>II. INTRODUCTION SOUS FORME D’HISTORIQUE: .....</b>	<b>14</b>
1. Les sources : .....	14
2. La découverte du centrosome :.....	15
3. Ultra structure : les centrioles au secours des centrosomes.....	20
- Le centriole .....	20
- La reproduction du centrosome.....	22
4. Les microtubules et le MTOC .....	24
5. Le centrosome moléculaire, première partie : purification et anticorps.....	26
- Le centrosome isolé .....	26
- La définition moléculaire du centrosome : les anticorps .....	28
6. La définition des systèmes modèles et des grands thèmes de recherche .....	29
- le centrosome nucléateur et organisateur des microtubules (MTOC) .....	29
- Le corps basal .....	31
- Le centrosome des levures (SPB) .....	33
- Le centrosome et la mitose.....	33
- Le centrosome et le cycle de division cellulaire (ovocytes d’échinodermes et d’amphibiens).....	35
- Le centrosome et le développement (Drosophile, C.elegans, Souris) .....	37
- Le centrosome et la polarité cellulaire (lymphocytes, locomotion).....	38
7. Le centrosome moléculaire deuxième partie : le séquençage des génomes.....	42
8. Résumé et conclusions .....	43
<b>III. PRESENTATION GENERALE DU CENTROSOME DES VERTEBRES.....</b>	<b>45</b>
1. Structure et dimensions .....	45
- Le centriole .....	46
- La matrice péricentriolaire .....	48
- Conclusion .....	49
2. Reproduction .....	49
- Description structurale de la reproduction semi-conservative.....	49
- Couplage au cycle de division cellulaire (dans les ovocytes et dans les cellules somatiques).....	53
- Assemblage de novo dans la ciliogenèse .....	57
- Hypothèses moléculaires .....	58
- Modèle centriolaire de l’assemblage du centrosome .....	61
-Conclusion .....	62
3. Organisation des microtubules .....	62
- Mécanismes de nucléation des microtubules .....	63

- Régulations de la nucléation et de l'ancrage au cours du cycle de division cellulaire et de la différenciation.....	66
- Régulation de la dynamique.....	71
- Conclusion .....	74
4. Composition moléculaire .....	74
- Protéines classées selon leur localisation.....	75
Protéines centriolaires .....	75
Protéines de la matrice (matrice proche, lien intercentriolaire, centrosome/Golgi/noyau) .....	76
- Protéines classées selon leur mode d'assemblage sur le centrosome .....	76
Protéines accumulées par les microtubules .....	76
Protéines qui forment des oligomères .....	78
Protéines solubles, protéines insolubles .....	79
Protéines concentrées au centrosome, protéines modifiées au centrosome .....	80
Protéines transitoirement localisées au centrosome .....	81
- Protéines classées suivant leur fonction.....	82
Protéines structurales.....	82
Scaffolding proteins .....	83
Nucléation des microtubules .....	83
Organisation des microtubules .....	84
Régulation de la duplication.....	85
Cycle de division cellulaire .....	85
Activités enzymatiques .....	86
- Conclusion .....	87
5. Fonctions plus ou moins avérées.....	88
- Mécanismes.....	88
- Organisation des microtubules.....	90
- Position du noyau/définition du plan de clivage.....	91
- Directionnalité de la motilité cellulaire, polarité cellulaire, intégrité cellulaire .....	94
- Contrôle du cycle cellulaire .....	97
- Quelques nouvelles pistes : apoptose, dégradation des protéine, confection des antigènes.....	99
- Development .....	100
Fécondation et développement précoce .....	100
Développement tardif .....	102
Organisme adulte (tissus et système immunitaire).....	103
Cancer.....	104
- Conclusion .....	106
6. Méthodes expérimentales et systèmes utilisés le plus couramment.....	107
- Le centrosome isolé .....	107
- Anticorps.....	109
- Ovocytes de xénope et autres ovocytes.....	109
- Cellules CHO (Chinese hamster ovary).....	110
- Drosophile, C.elegans, souris.....	111
- Recherche d'homologues (levures, ciliés, flagellés).....	111
- Cellules différenciées (polymorphonucléaires, myotubes, ostéoclastes, neurones, cellules épithéliales) .....	112
- Laser.....	113
- Conclusion sur les lacunes techniques .....	113

<b>IV. PHYLOGENIE DU CENTROSOME.....</b>	<b>115</b>
1. Le centriole : un caractère dérivé propre des eucaryotes .....	116
- Tentative de définition élargie du centrosome .....	117
- Arbre phylogénétique des centrosomes .....	118
Les formes dérivées des centrosomes centriolaires: .....	118
Les centrioles transitoires.....	119
L'absence de centrosome identifiable .....	119
- Convergences.....	120
Centrosome et cinétosome .....	120
Plaques et endomitose .....	124
Autres facteurs qui semblent accompagner les modifications du centrosome et donc l'absence de cils .....	125
- Centrosome et corpuscule fusorial : le centrosome mitotique.....	130
- Conclusion .....	131
2. Le SPB de <i>S.cerevisiae</i> : le centrosome le mieux connu et une source d'inspiration constante pour l'étude du centrosome des autres organisme .....	132
- La 'levure verte' .....	135
3. Analyse comparative du mode de reproduction de quatre types de centrosome .....	136
- Un schéma de base très conservé.....	137
- Ce qui change et ce qu'on peut en conclure .....	139
Orthogonalité des centrioles et orientation du fuseau .....	139
Quand commence la reproduction du centrosome ? .....	142
- Conclusion .....	144
4. Conservation moléculaire, conservation fonctionnelle .....	145
- Le complexe de nucléation .....	145
- Le système centrine.....	146
- Le déplacement du noyau .....	151
- Les sous-parties fonctionnelles du centrosome.....	152
5. Conclusion.....	153
- L'évolution des contraintes évolutives .....	153
- La modularité du centrosome.....	154
- Petite histoire sur l'origine des eucaryotes .....	155
 <b>CENTROSOME ET MOUVEMENT CELLULAIRE .....</b>	 <b>161</b>
<b>I. INTRODUCTION :</b> .....	<b>162</b>
1. Généralités sur le mouvement cellulaire .....	162
- Types de mouvements.....	162
- Les mécanismes moléculaires.....	165
- Le cytosquelette .....	166
2. Centrosome et mouvement cellulaire : une vieille idée un peu confuse .....	169
- Le mouvement cellulaire et le cinétosome.....	169
Histoire : le 'centre dynamique de la cellule' .....	169
Le cinétosome .....	170
Le centriole.....	171
- La polarité centrosome/noyau.....	173
- Le rôle des microtubules dans la motilité cellulaire .....	175
- MTOC et motilité cellulaire.....	178
 <b>II. RESULTATS :</b> .....	 <b>181</b>



1. Résumé des principaux résultats et des conclusions .....	181
2. Papier I : The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells .....	183
<b>III. DISCUSSION :</b> .....	<b>184</b>
1. Quelques critiques .....	184
2. Comment reformuler la question et quel système expérimental utiliser .....	188
- Ce qu'apporte ce travail .....	188
- Suite 1 : Régulation de la dynamique du centrosome par p160ROCK (soumis pour publication).....	189
- Suite 2 : Importance du relargage des microtubules dans la motilité des fibroblastes de vertébré (en préparation). .....	191
- Plus loin : dans quels systèmes travailler ? .....	193
Systèmes expérimentaux : .....	193
Que regarder dans ces systèmes ? .....	194
Perturbations du centrosome : détruire (laser) ou perturber (laser, surexpressions, RNAi) .....	195
 <b>CENTROSOME ET CYCLE DE DIVISION CELLULAIRE .....</b>	 <b>197</b>
<b>I. INTRODUCTION :</b> .....	<b>198</b>
1. Généralités sur le cycle cellulaire.....	198
2. Centrosome et cycle cellulaire : un juste milieu entre 'l'organe de division' et le simple passager. ....	200
- Histoire.....	200
- Les structures auto-assemblées .....	201
- Les rôles du centrosome.....	203
Fixer le nombre de pôle.....	203
Déterminer la position du fuseau .....	203
Implication dans les systèmes de contrôle .....	204
 <b>II. RESULTATS :</b> .....	 <b>207</b>
1. Résumé des résultats .....	207
2. Papier II : Centrosome dependant exit of cytokinesis in animal cells.....	210
 <b>III. DISCUSSION :</b> .....	 <b>211</b>
1. Quelques critiques .....	211
2. Pistes.....	215
2. Le centrosome et l'espace cellulaire .....	216
 <b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....</b>	 <b>223</b>
<b>I. DEFINITION(S) DU CENTROSOME.....</b>	<b>224</b>
<b>II. QUE VEUT DIRE 'FONCTION' DU CENTROSOME ? .....</b>	<b>226</b>
1. Une définition.....	226
2. Un modèle purement spéculatif : le centrosome mécanosenseur.....	227
3. Dans quels systèmes expérimentaux étudier les fonctions du centrosome ? .....	231
 <b>ANNEXES .....</b>	 <b>234</b>

<b>ANNEXE I : LE ROLE DE LA NINEINE DANS L'ANCRAGE DES BOUTS MOINS DES MICROTUBULES. ....</b>	<b>235</b>
1. Résumé : .....	235
2. Papier 3 : Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites : the role of ninein .....	236
<b>ANNEXE II : UN SYSTEME IN VITRO POUR L'ETUDE DU CYCLE DE DUPLICATION DU CENTROSOME.....</b>	<b>237</b>
1. Résumé .....	237
2. Papier IV : Centrosome Reproduction <i>in vitro</i> : Mammalian Centrosomes in <i>Xenopus</i> Lysates.....	238
<b>ANNEXE III : Articles de vulgarisation sur le mouvement cellulaire et ses principes moléculaires (Encyclopaedia Universalis, 2000 et 2001).....</b>	<b>239</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>240</b>
<b>Livres .....</b>	<b>240</b>
<b>Références à valeur historique .....</b>	<b>240</b>
<b>Bibliographie alphabétique .....</b>	<b>241</b>
<b>Thèses .....</b>	<b>270</b>



# Résumé

Cette thèse tente d'aborder, avec quelques détours, deux questions centrales concernant le centrosome des vertébrés : son rôle dans la motilité cellulaire et son rôle dans le cycle de division cellulaire.

Après une introduction en trois parties (un tour d'horizon dans une optique historique, un exposé détaillé des connaissances actuelles, puis une réflexion plus générale sur des bases phylogénétiques), deux travaux sont présentés : une étude des rôles respectifs des deux centrioles du centrosome des cellules de vertébrés, puis une étude du comportement particulier du centrosome dans ces cellules en sortie de mitose.

L'ensemble de ce travail se fonde sur un outil précieux : l'établissement de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la centrine 1 humaine couplée à la GFP, ce qui constitue un excellent marqueur des centrioles et de leur stade de maturation. En effet, le centrosome des vertébrés contient deux structures microtubulaires appelée centrioles qui se reproduisent en synchronie avec le cycle de division cellulaire par un mécanisme de duplication, un nouveau centriole étant assemblé à proximité de chaque centriole présent. Il y a donc dans chaque cellule, après une mitose, un nouveau et un ancien centriole aussi appelés centriole parental ou centriole père et centriole fils.

La première étude, après avoir succinctement défini le comportement des centrioles dans les différentes phases du cycle, se concentre plus précisément sur la phase G1 pendant laquelle il a pu être observé que les deux centrioles peuvent transitoirement se séparer de plus de dix microns. L'un des deux centrioles, qui a pu être identifié comme le centriole le plus jeune, a une mobilité parfois importante, alors que le plus ancien, qui est associé à l'aster de microtubules par des appendices qui sont caractéristiques de son ancienneté reste près du centroïde de la cellule. La différence d'abondance des microtubules à proximité des deux centrioles a pu être attribuée à une régulation différentielle de l'ancrage : le centriole le plus ancien capture les microtubules qui sont nucléés dans un rayon de quelques microns autour de lui, alors que le centriole fils, qui a une capacité de nucléation équivalente, a une capacité d'ancrage des microtubules réduite. Ainsi, quand les deux centrioles sont éloignés l'un de l'autre, de nombreux microtubules libres peuvent être observés dans la cellule, au contraire, quand ils sont proches, la plupart des microtubules cellulaires sont ancrés sur le centrosome (et en particulier sur le centriole père). Nous avons donc proposé que la cellule puisse modifier son réseau microtubulaire en modulant la distance intercentriolaire.

La deuxième étude présentée porte sur un comportement particulier du centriole parental en fin de mitose : après que les cellules se sont étalées, mais alors qu'elles sont encore reliées par un pont cytoplasmique, les deux centrioles, dans chaque cellule fille, se séparent puis le centriole parental quitte sa position centrale et stationne pendant 10 à 30 minutes à proximité du pont cytoplasmique intercellulaire. Le pont se pince alors de chaque côté de la pièce intermédiaire puis se rompt lorsque le centriole parental regagne sa position près du noyau. Nous avons pu déterminer que le pincement du pont correspondait au détachement des faisceaux de microtubules qu'il contient. Nous avons ensuite, à l'aide de drogue qui dépolymérisent les microtubules, suggéré l'existence d'un contrôle de la présence du centriole parental dans le pont. Nous avons étudié des cas de cellules acentriolaires et pu mettre en évidence des défauts liés à la cytokinèse. Enfin, il nous est apparu, à la suite d'expériences sur des substrats plus ou moins adhésifs que l'adhésion de la cellule à son substrat est un des paramètres clé de la régulation de cet événement de fin de mitose.

Des interprétations plus spéculatives sont proposées dans les discussions qui suivent l'exposé des résultats, ainsi que des expériences pour les tester.

# Abréviations

(page à remplir par le lecteur)

## **INTRODUCTION GENERALE**



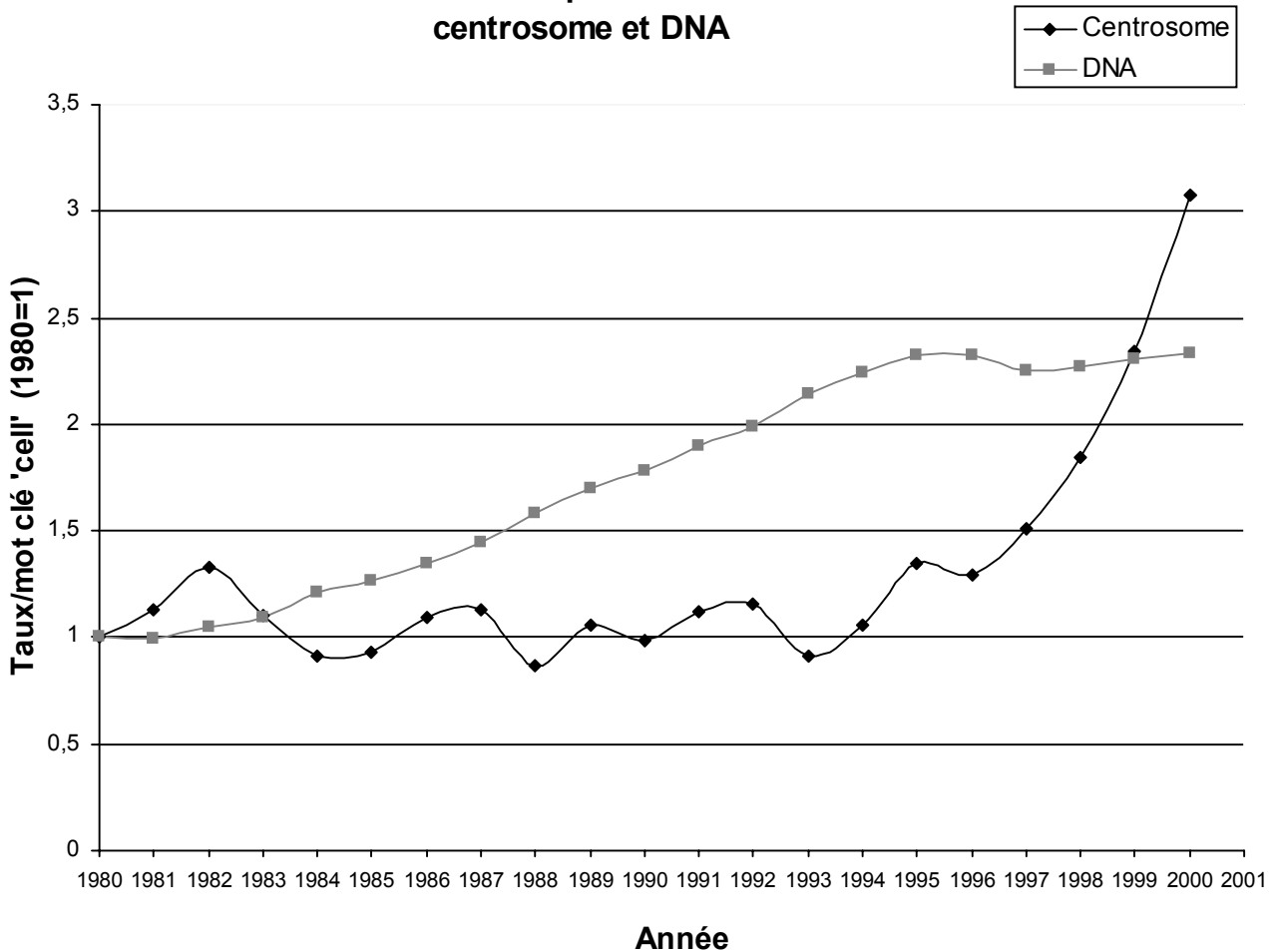
L'avant propos a pour but d'éclairer la construction logique de cet ouvrage et sa lecture devrait permettre à chacun de naviguer plus à son aise et selon sa motivation propre : rechercher un renseignement particulier ou suivre le fil d'une réflexion. Aucune de ces deux approches ne doit nécessiter une lecture linéaire qui serait trop fastidieuse.

## **I. AVANT PROPOS :**

Le travail présenté dans cette thèse est à proprement parler un travail de biologie cellulaire. Il pose des questions d'ordre fonctionnel et comporte très peu d'analyses chimiques ou moléculaires. Il a néanmoins été rendu possible par l'énorme quantité de connaissances biochimiques et moléculaires accumulées ces dix dernières années dans tous les domaines mais en particulier en ce qui concerne le centrosome qui, du fait de sa taille (de l'ordre du micron) et de son faible nombre de copies par cellule (une) était resté jusqu'à récemment très 'pauvre' en constituants moléculaires connus et donc très difficile à étudier. Cet organite a été par le passé l'objet d'un grand nombre d'expériences fonctionnelles dans des systèmes très variés. Ces expériences l'ont rendu de plus en plus intrigant, mais, en l'absence de données génétiques ou moléculaires, elles sont souvent restées difficiles à interpréter. Ainsi, le centrosome a longtemps été un objet d'étude réservé à quelques chercheurs acharnés convaincus de son importance. La situation semble s'être récemment renversée (voir la figure 1) grâce à un afflux soudain de données moléculaires et de techniques plus adaptées. La montée en flèche des publications sur le centrosome est aussi le reflet d'une préoccupation qui touche désormais tous les domaines de la biologie : la localisation des composants cellulaires, secondée par des techniques de microscopie de plus en plus performantes (microscopie confocale, déconvolution, GFP, etc...). On ne peut plus se contenter d'analyses



## Evolution des taux de publication des mots clé centrosome et DNA



**Figure 1 : L'envolée du nombre de publications concernant le centrosome à partir de 1997**

Pour chaque année, le nombre de publications donné par Medline (NLM) pour l'entrée 'centrosome OR centrosomes OR centriole OR centrioles OR SPB' a été rapporté au nombre de publications correspondant à l'entrée 'cell', et ramené à 1 pour l'année 1980. Le même procédé a été employé pour l'entrée 'DNA'. Le nombre total de publications augmentant, le mot 'cell', qui se trouve dans toutes les publications de biologie cellulaire m'a semblé être un bon moyen de normaliser. L'année 1980 est prise comme point de départ, car avant cette date PubMed est très incomplet et risque de défavoriser certaines périodes de manière artificielle. Le taux a été ramené à 1 pour montrer son évolution, mais, en nombre, l'entrée 'DNA' donne environs cent fois plus de publications que l'entrée correspondant à centrosome.

J'ai fini par me rendre compte que pour n'exclure quasiment aucune publication sur le centrosome (qui a de nombreuses dénominations), la bonne entrée est la suivante :

centrosome OR centrosomes OR centrosomal OR SPB OR SPBs OR MTOC or centriole OR centriolar OR centrioles OR (basal AND (body OR bodies)) OR kinetosome OR kinetosomes OR (spindle AND (pole or poles))

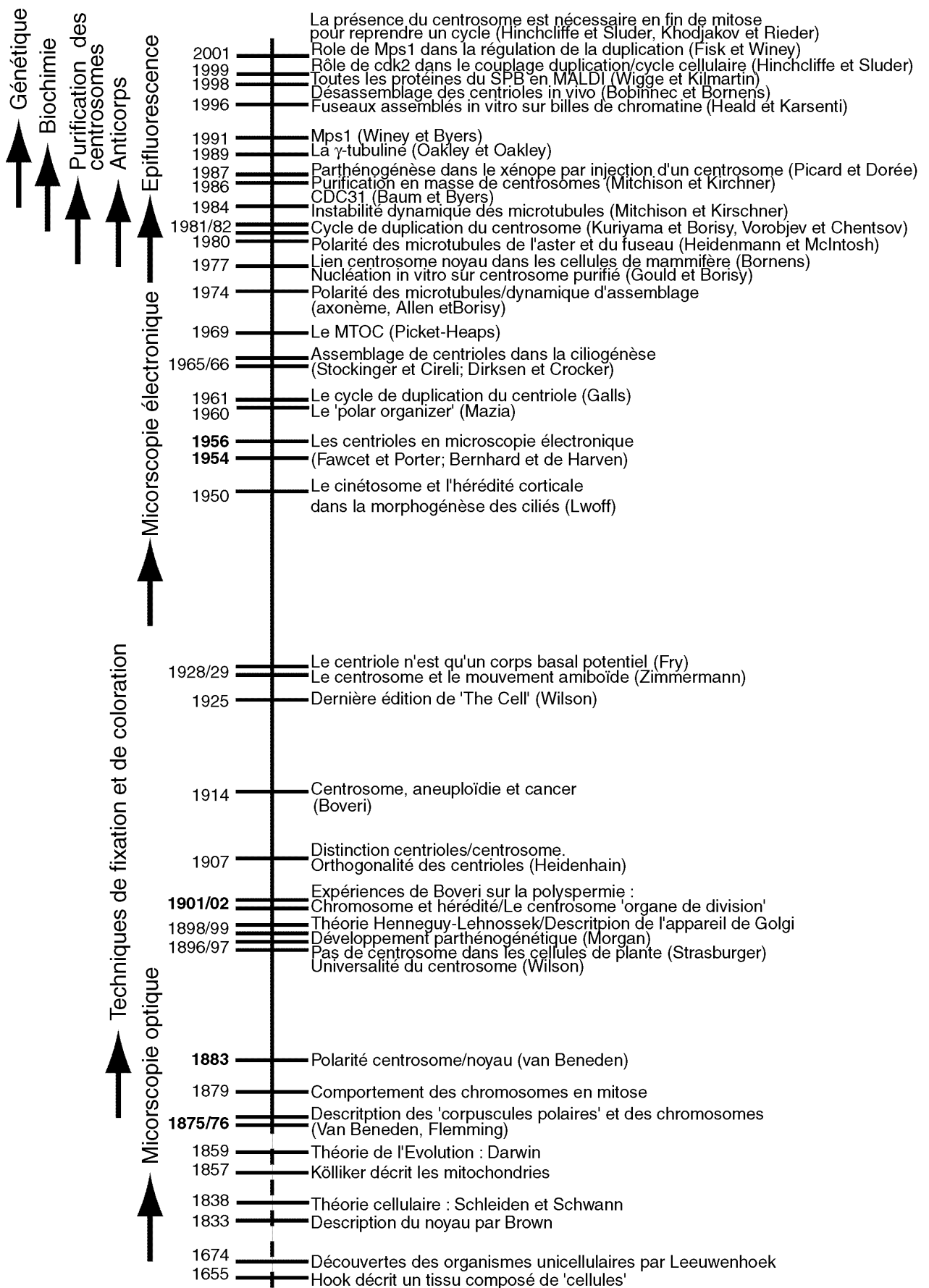
biochimiques, la localisation cellulaire d'une protéine est un élément essentiel à la détermination de sa fonction (et même de sa chimie), et plus précieuse encore est l'étude dynamique de cette localisation. Or un nombre important de protéines, souvent considérées comme des éléments clés dans des cascades de signalisation ou des systèmes de régulation de divers mécanismes cellulaires ont été localisées à proximité du centrosome – mais sans qu'on sache le plus souvent évaluer le rôle de cette localisation dans leur fonction. Le centrosome fait ainsi irruption dans les champs les plus divers de la biologie (apoptose, régulation du cycle de division cellulaire, développement, etc...). Il s'agira, tout au long de ce mémoire, d'approcher cet organite encore mal connu qu'est le centrosome afin de définir, à travers un foisonnement de publications, quelques pistes de réflexion et de reformuler de vieilles questions à l'aide des techniques expérimentales récentes.

L'étude du centrosome remonte au tout début de la biologie cellulaire. Pourtant, les questions que se posaient les premiers biologistes qui l'ont étudié sont toujours d'actualité après plus d'un siècle de recherche et un nombre considérable de publications. Il y a indéniablement, et peut-être plus qu'ailleurs, une forte composante 'héritée' dans la manière dont le centrosome est abordé, probablement parce qu'il a toujours un côté mystérieux qui nous pousse à trouver appui auprès des 'anciens'. Il est donc utile de tenter d'extraire des polémiques qui agitent la recherche sur le centrosome leur aspect 'historique' pour pouvoir ensuite mieux se concentrer sur les faits expérimentaux. C'est ce besoin de faire la part des choses qui a motivé l'insertion d'une partie historique précédant la véritable introduction aux différentes notions importantes pour la compréhension de l'état actuel des connaissances sur le centrosome. J'ai essayé dans cette partie 'historique' de reproduire les 'flous' et les points de consensus de chaque époque, qui sont souvent devenus, avec le temps, respectivement des bêtes noires à éviter et des certitudes rassurantes qu'on ne remet plus en question.

L'introduction proprement dite restera assez générale et doit constituer une véritable 'présentation', comme on présente un nouveau venu. Elle devra n'omettre aucun des caractères susceptibles d'attiser la curiosité mais éviter la polémique. Une étude critique des différents travaux se rapportant plus précisément à cette thèse sera développée séparément au sein des chapitres s'articulant autour des principaux thèmes qui ont guidé mon travail: centrosome et mouvement cellulaire, centrosome et cycle de division cellulaire, duplication du centrosome/centrosome et mitose.

J'ai aussi ressenti le besoin de replacer le centrosome des vertébrés, sur lequel a porté mon travail, dans un cadre phylogénétique. Le centriole, qui est l'élément de base du centrosome des vertébrés, est en effet un caractère dérivé propre des eucaryotes, mais sa structure a évolué dans certains phyla et il a même parfois complètement disparu. Ainsi les études comparatives, les analogies et les homologies (fonctionnelles ou moléculaires) possibles sont nombreuses et ont été d'une grande utilité dans la compréhension actuelle de cet organe. C'est à partir de ce type d'étude qu'on devrait pouvoir aborder la question plus générale de la place du centrosome dans 'l'économie cellulaire'.



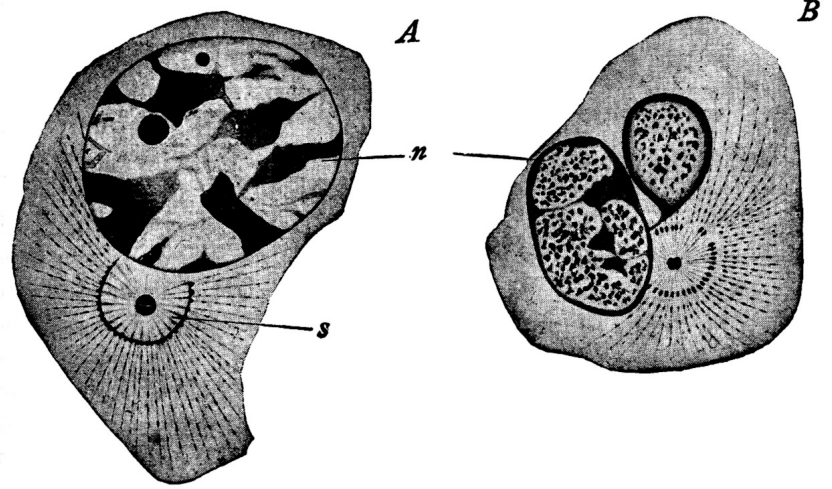


**Figure 2 : Quelques dates**  
Sans soucis d'exhaustivité

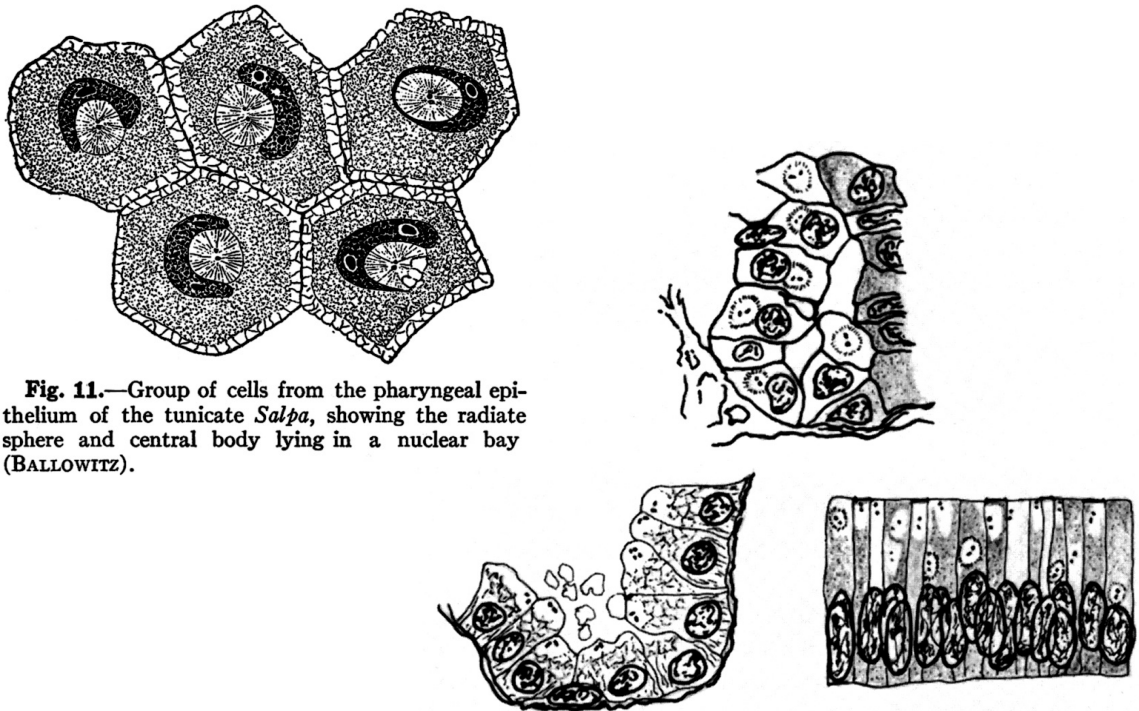
## **II. INTRODUCTION SOUS FORME D'HISTORIQUE:**

### **1. Les sources :**

Pour se plonger dans l'océan des publications concernant le centrosome, les revues sont devenues des outils indispensables. Il existe actuellement quatre volumes entièrement consacrés au centrosome, publiés respectivement en 1982, 1992, 1999 et 2000. J'ai suivi leurs contenus respectifs pour évaluer la progression de ce champ de recherche. Il faut cependant noter que seul le premier de ces quatre volumes représente un véritable effort de synthèse des connaissances concernant le centrosome, puisqu'il est le seul à être écrit par un auteur unique, alors que les trois autres sont des recueils d'articles de spécialistes des différents domaines qui se rattachent aujourd'hui à l'étude du centrosome, mais qui ont souvent leur logique propre et ne fournissent pas de réflexion générale sur le centrosome lui-même et ses fonctions (c'est surtout vrai pour le dernier recueil, qui marque l'explosion des connaissances sur le centrosome et ne parvient pas à en donner une vue synthétique). On peut en revanche trouver cet effort de synthèse dans un certain nombre de revues plus courtes qui traitent du centrosome en général et dont les dates de publication s'étalent entre 1971 et 2001 (elles sont toutes citées dans la bibliographie : Fulton, 1971; Hartman, 1975 ; Bornens and Karsenti, 1984; Brinkley, 1985; Mazia, 1987; Paoletti and Bornens, 1997; Andersen, 1999; Urbani and Stearns, 1999 ; Doxsey, 2001; Rieder et al., 2001). Il faut aussi noter l'intérêt historique du livre de Wilson (dernière édition en 1925) qui traite à de nombreuses reprises du centrosome et de celui de Lwoff (1950) qui discute d'une morphogenèse complexe liée à la reproduction des centrioles/cinétosomes, celles des unicellulaires ciliés. Enfin, j'ai aussi eu recours à la



**Fig. 10.**—Leucocytes of the salamander (HEIDENHAIN). *A*, cell with a single nucleus containing a very coarse network of chromatin and two nucleoli (plasmosomes); *s*, permanent aster, its center occupied by two central bodies surrounded by a microsome-ring; *B*, similar cell, with double nucleus; the smaller dark masses in the latter are oxi-chromatin-granules (linin), the larger masses are basic chromatin.



**Fig. 11.**—Group of cells from the pharyngeal epithelium of the tunicate *Salpa*, showing the radiate sphere and central body lying in a nuclear bay (BALLOWITZ).

Figure 1.1. Drawings from engravings by Zimmermann (1898) showing the duplex centrosomal (centriolar?) structures in adenohypophysis (top), a secretory epithelium (left) and a columnar epithelium of the upper female genital tract (right). The accuracy of positioning is remarkable.

### Figure 3 : La cellule au début du vingtième siècle

Les deux dessins du hauts sont tirés de l'édition de 1925 de *The Cell* (Wilson). Le dessin du bas est reproduit par D.N. Wheatley dans *The Centriole* (1982). Ce sont différents types de cellules *in vivo* fixées et colorées puis observées à l'aide d'un microscope optique. La précision des observations est remarquable, on reconnaît les centrioles dans les deux dessins du bas, et il semble même qu'ils soient représentés par Zimmermann non pas comme des points mais comme des bâtonnets.

bibliographie des auteurs les plus prolifiques du domaine (Michel Bornens en tête avec une soixantaine de publications sur le centrosome, suivi de Eric Karsenti et de Gary Borisy avec une quarantaine de publications, puis de Conly Rieder, David Glover et Brinkley autour de trente, enfin d'une quinzaine d'aficionados aux alentours de 20 publications) et aux thèses des étudiants de Michel Bornens (voir bibliographie).

## **2. La découverte du centrosome :**

Nous reviendrons à plusieurs reprises sur la définition du centrosome. Elle a évolué au cours du temps et s'est à peu près stabilisée aujourd'hui, avec les habituelles zones d'ombres et les frontières plus ou moins floues qui accompagnent toute définition. On peut rattacher ce qu'on appelle aujourd'hui le centrosome à certains corpuscules qui furent décrits dans la dernière décennie du XIX<sup>ème</sup> siècle grâce à une microscopie optique de qualité et à l'apparition de techniques de fixation et de contraste des échantillons. D'une manière générale, la biologie cellulaire doit beaucoup à la microscopie qui a permis de mettre en évidence l'existence des cellules et de leur reproduction par duplication, ce qui a conduit à la Théorie Cellulaire et à la Théorie de l'Evolution (voir la chronologie, figure 2).

Des 'corpuscules polaires' (ou corpuscules fusoriaux) furent tout d'abord remarqués, en même temps que les chromosomes étaient décrits pour la première fois, dans des cellules en division, par Flemming (1875) et van Beneden (1876). Ces corpuscules situés de part et d'autre des chromosomes furent ensuite observés dans de nombreuses cellules. Théodore Boveri, l'un des scientifiques les plus impliqués dans ces premières explorations, proposa en accord avec des résultats similaires de van Beneden que ces corpuscules persistent dans les cellules même quand celles-ci ne se divisent pas (1887), se situant le plus souvent au centre de



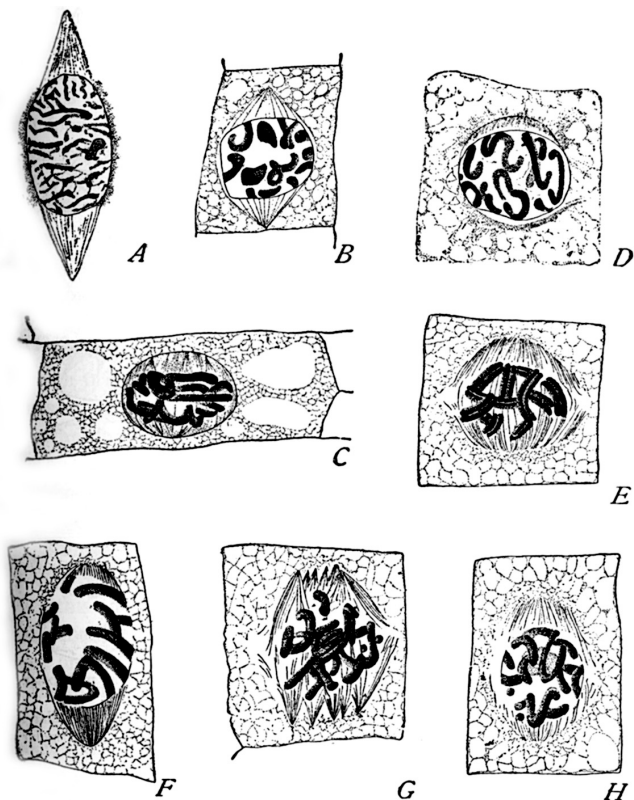


Fig. 64.—Spindle-formation by polar caps in vegetative cells of plants.  
*A*, in *Psilotum* (ROSEN); *B*, *Ephydra*, *C*, *Vicia* (HOF); *D*, *Allium* (NEMEC); *E-H*, *Allium* (Mc  
 CORM); *C* and *G* are multipolar diarch spindles.

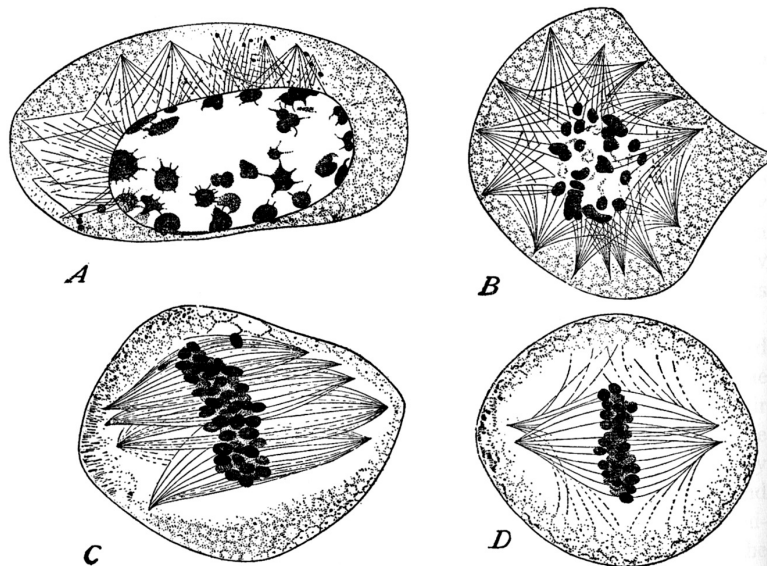


Fig. 65.—Division of spore-mother cells in *Equisetum*, showing anastral multipolar spindle-formation (OSTERHOUT).

*A*, early prophase, "kinoplasmic" fibrillae in the cytoplasm; *B*, multipolar fibrillar figure invading the nuclear area, after disappearance of the nuclear membrane; *C*, multipolar spindle; *D*, quadri-polar spindle which finally condenses into a bipolar one.

#### Figure 4 : Les cellules de plante ne semblent pas posséder de centrosome

Cette découverte qu'on attribue à Strasburger, déchet le centrosome de sa place parmi les caractéristiques universelles de la cellule eucaryote. On sait aujourd'hui que les plantes ont toutes connu les centrioles (de nombreuses plantes en possèdent encore dans leurs gamètes ou leurs spores flagellées) mais que certaines les ont perdu secondairement.

la cellule, dans une région appelée centrosphère ou sphère d'attraction à cause des rayons qui semblaient parfois en émaner radialement. Ainsi fut imaginée l'existence d'un petit organe présent dans toutes les cellules, composé de deux corpuscules appelés centrioles par Boveri - corpuscules placés au centre de la cellule en interphase puis se séparant pour se placer aux pôles du fuseau en mitose. Le terme de centrosome sera repris et imposé par Wilson dans les éditions successives de 'The Cell'. Il souligne déjà la confusion – aujourd'hui encore fréquente - entre centrosome et centrioles, les centrioles étant définis par Boveri comme plus petits et se divisant en premier (Wilson, p673). Cette première période de découverte du centrosome qui s'étend de 1875 à 1920 est marquée par un grand enthousiasme et l'émergence de quelques paradigmes qui resteront au centre des questions concernant cet organe. D.N.Wheatley, dans l'introduction de la première - et seule - monographie consacrée au centrosome (The Centriole : A central Enigma of Cell Biology, Elsevier Biomedical Press, 1982) en relève trois :

***- le centrosome est un organe qui existe dans un grand nombre de cellules et peut-être dans toutes*** (proposé par Wilson en 1896) – Certains considèrent à l'époque que l'absence de centrosome dans une cellule relève d'un problème de fixation ou d'observation.

La question de la définition du centrosome commence à se poser, par rapport à d'autres structures qui y sont associées, comme l'aster, un ensemble de rayons observé aux pôles du fuseau mitotique, qui persiste en interphase dans certaines cellules (défini en 1896 par Flemming). A la même époque, plusieurs études mettent en cause l'universalité du centrosome, en particulier son existence dans les cellules de plantes (Strasburger, 1897). Ces problèmes de définition du centrosome, bien que posés en d'autres termes, sont toujours d'actualité.

***- le centrosome se duplique une fois par cycle de division cellulaire, de manière autonome.***

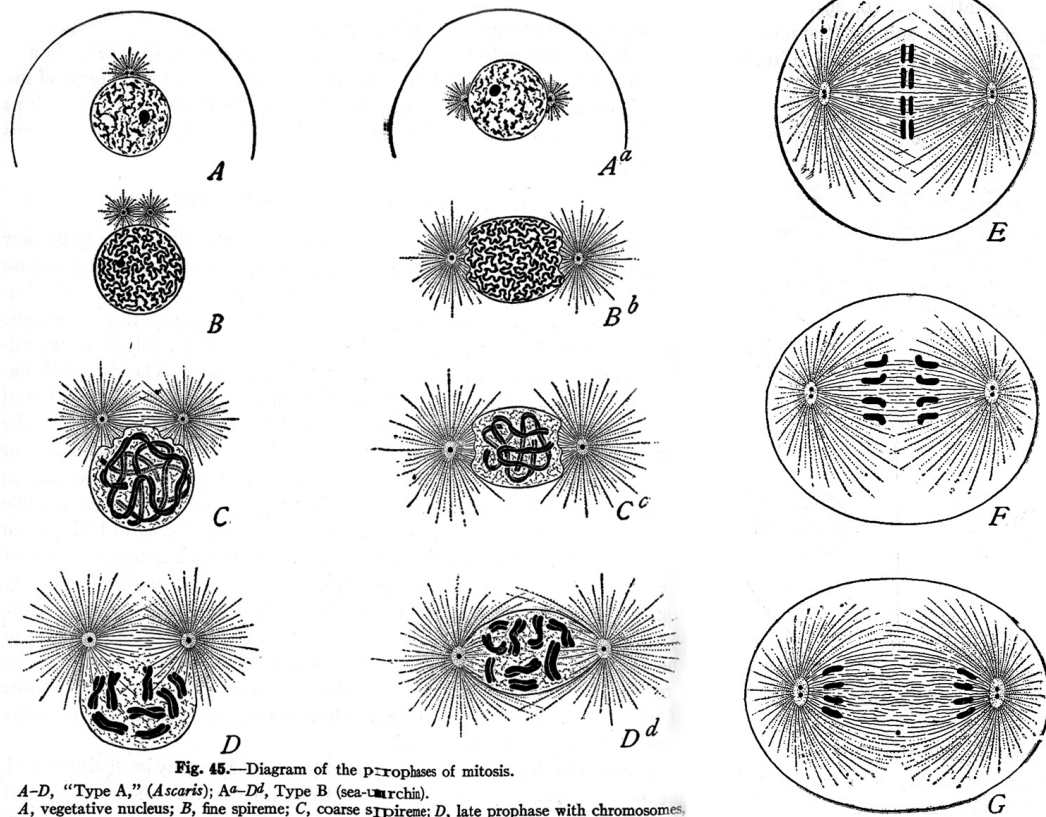


Fig. 45.—Diagram of the prophases of mitosis.  
*A-D*, "Type A," (*Ascaris*); *A<sup>a</sup>-D<sup>d</sup>*, Type B (sea urchin).  
*A*, vegetative nucleus; *B*, fine spireme; *C*, coarse spireme; *D*, late prophase with chromosomes and spindles forming.

Fig. 46.—Diagram of the middle phases of mitosis.  
*E*, metaphase; *F*, *G*, earlier and later anaphases.

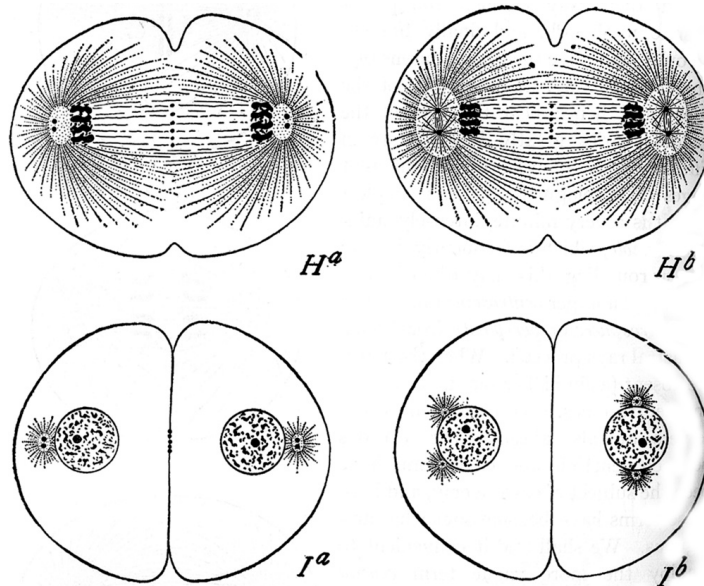


Fig. 47.—Diagram of closing phases of mitosis. *H<sup>a</sup>* and *I<sup>a</sup>*, "Type A"; *H<sup>b</sup>* and *I<sup>b</sup>*, Type B showing two slightly different conditions in the interphase.

### Figure 5 : Le cycle de division cellulaire dans un ovocyte d'échinoderme.

La précision de la description des structures polaires montre à quel point cet organe intriguait. On distingue très bien l'aplatissement des pôles en métaphase et la séparation des deux centrosomes dès l'anaphase. Dans ces ovocytes, les cycles de division s'enchaînent très rapidement, il n'y a pas de phase G1 et les centrosomes recommencent à se dupliquer dès la fin de la mitose (D'après Wilson, 1925).

Cette proposition vient de l'observation fréquente de deux centrosomes dans les cellules interphasiques, comme pour 'préparer' la division (Wilson, 1925) et de l'apparition du nouveau centrosome à proximité de l'ancien, ce qui suggère une scission. En effet, la technique de fixation utilisée met particulièrement bien en évidence deux petits corpuscules au sein du centrosome et certains auteurs remarquent déjà bon nombre de caractéristiques confirmées plus tard à l'aide du microscope électronique, comme l'orthogonalité de ces corpuscules oblongs à chaque pôle du fuseau mitotique et leur séparation en fin de mitose (Heidenhain, 1907, cité par D.N. Wheatley). Une controverse s'installe sur la possibilité d'assemblage de centrosome '*de novo*' (c'est à dire sans présence préalable d'un centrosome dans la cellule) à partir de l'observation dans certains ovocytes de la formation de multiples asters à la suite de certains traitements (Morgan, 1899). Il est étonnant de constater à cette occasion, que cette controverse est aujourd'hui toujours en train, bien que la conception que l'on a des différents termes ('*de novo*' ou pas) ait totalement changé. On peut déceler un premier signe de 'persistance' historique, à travers cette notion 'd'autonomie' du centrosome qui est suffisamment mal définie et suffisamment attirante pour survivre à toutes les contradictions. Par exemple, la genèse par duplication pourra être envisagée plutôt comme un système de contrôle du nombre de centrosome que comme un mécanisme inné à la genèse d'un nouveau centrosome (discuté dans Fulton, 1971). La compréhension du phénomène de duplication du centrosome n'a progressé que très récemment, et principalement en ce qui concerne son couplage au cycle de division cellulaire.

***- La principale fonction du centrosome est de fournir à la cellule un 'centre dynamique' qui lui permet de se diviser.***

Cette conception du rôle du centrosome est due en grande partie au travail de Théodore Boveri sur les premiers stades du développement embryonnaire : « L'œuf mature possède tous les organes et toutes les qualités nécessaires à la division, excepté le centrosome, qui initie la

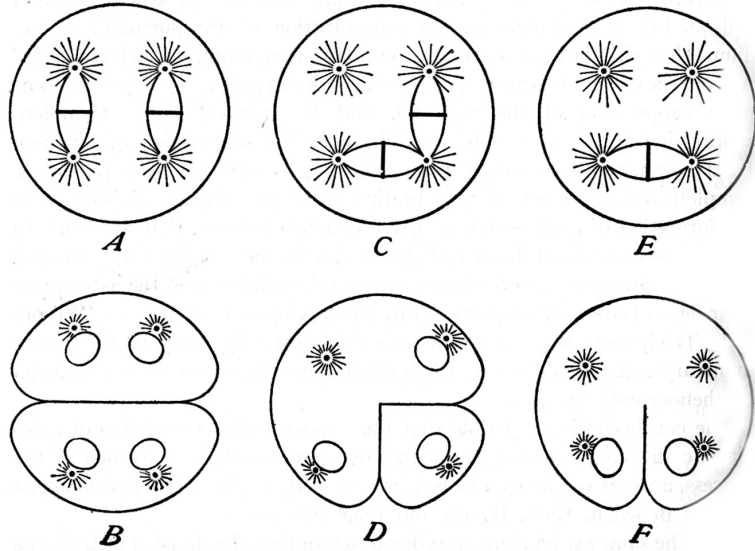


Fig. 74.—Division of dispermic eggs in sea-urchin eggs, schematic (BOVERI).  
A, C, E, eggs before division, showing various connections of the asters; B, D, F, resulting division in the three respective cases, showing cleavage only between centers connected by a spindle.

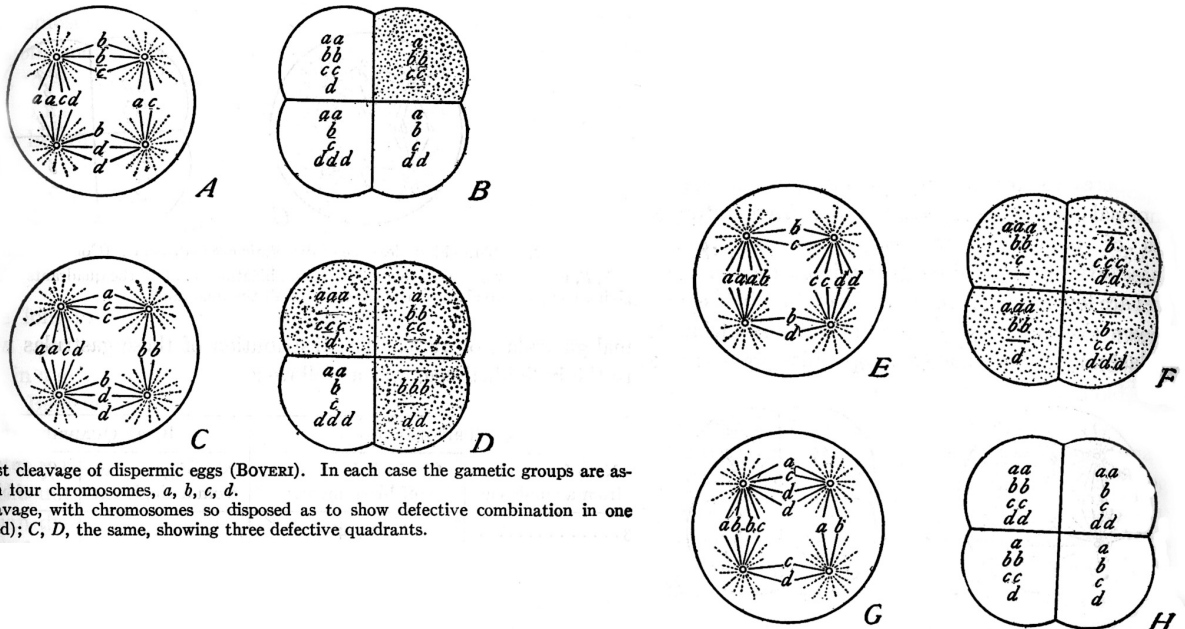


Fig. 433.—First cleavage of dispermic eggs (BOVERI). In each case the gametic groups are assumed to contain four chromosomes, *a*, *b*, *c*, *d*.  
A, B, first cleavage, with chromosomes so disposed as to show defective combination in one quadrant (stippled); C, D, the same, showing three defective quadrants.

Fig. 434.—First cleavage of dispermic eggs (BOVERI). (Continuation of Fig. 433)  
E, F, first cleavage producing defective combinations in all of the quadrants; G, H first cleavage giving complete combination (*a*, *b*, *d*, *c*), in all the quadrants.

### Figure 6 : Les expériences de dispermie de Boveri.

Le dessin du haut représente les expériences qui ont permis à Boveri de proposer que le centrosome soit un 'organe de division'. Les deux dessins du bas représentent les analyses de la distribution des chromosomes qui ont conduit Boveri à proposer qu'ils soient le support de l'information génétique et qu'une mauvaise répartition (une aneuploïdie) puisse entraîner des défauts de développement et soit, par analogie, responsable des anomalies des cellules cancéreuses. C'est la première expression, dès la découverte du rôle des chromosomes, de l'importance du contrôle du nombre de centrosomes présents dans chaque cellule. On peut remarquer que le cas de deux blastomères défectueux n'est pas représenté. En effet, cela nécessiterait l'absence de chromosome entre deux des pôles, et ne conduirait pas à la formation de quatre blastomères. (D'après Wilson, 1925)

division. D'autre part, le spermatozoïde contient un centrosome, mais il lui manque la substance dans laquelle cet organe de division pourrait exercer son activité. Par l'union de ces deux cellules lors de la fécondation, tous les organes nécessaires à la division sont réunis. » (phrase citée dans Fulton, 1971, p171). La controverse qu'elle engendra est toujours l'objet de nombreuses publications aux titres sensationnels (Hyman, 2000; Vidwans and O'Farrell, 1999; Waters and Salmon, 1997) qui annoncent la fin du centrosome, et qui souvent cachent mal l'envie qu'a l'auteur de tordre le cou à cet organite insaisissable en le bannissant des principes universels qui définissent une cellule eucaryote – ce qui équivaut pour beaucoup à une condamnation au purgatoire des particularités. Outre le fait qu'on sait aujourd'hui que, s'il y a des principes universels dans le vivant, ils sont à chercher à l'échelle des molécules, il n'est pas correct de vouloir nier l'importance du centrosome 'en général' au motif que les plantes se passent de cet organite pour se diviser, alors que l'absence de centrosome s'accompagne toujours d'un changement radical dans l'organisation cellulaire et dans le mode de division (voir partie phylogénie). Comme souvent, les expériences réalisées dans le contexte de ces débats mal posés ont néanmoins permis de clarifier considérablement le rôle du centrosome dans la division cellulaire (Khodjakov et al., 2000).

Une autre idée de Boveri rencontre aujourd'hui un écho grandissant : l'existence d'un lien entre une dérégulation du cycle de duplication du centrosome et la cancérogenèse. Boveri observa en effet qu'une fécondation par plusieurs spermatozoïdes conduisait à la formation de fuseaux multipolaires et à une mauvaise répartition des chromosomes entre les cellules filles (aneuploïdie). Il attribua la multipolarité à la présence de centrosomes surnuméraires puisqu'il y avait une corrélation entre le nombre de spermatozoïdes et le nombre de pôles. Or il avait pu se convaincre qu'une aneuploïdie pouvait être à l'origine du développement de cellules cancéreuses. Il en déduisit qu'il était important que la cellule possède exactement deux

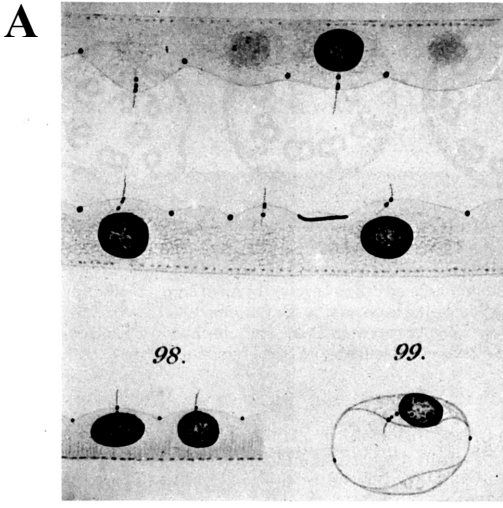


Figure 6.5. Zimmerman (1898) described cells with fine hair-like projections coming from the same bodies he had called centrosomes. In some cases, they protrude into large vacuoles (cf. Figure 6.1).

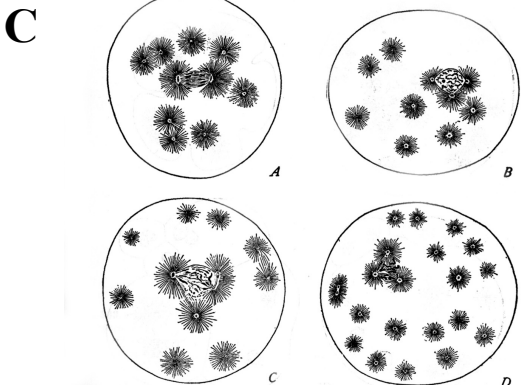


Fig. 331.—Cytasters in the artificial parthenogenesis of *Toxopneustes*, after treatment with hypertonic sea-water. A, dicentric cleavage-figure in anaphase, cytasters and cyto-amphasters; B, earlier stage, early tripolar figure; C, slightly later stage, following last; D, tripolar figure, cytaster dividing at left.

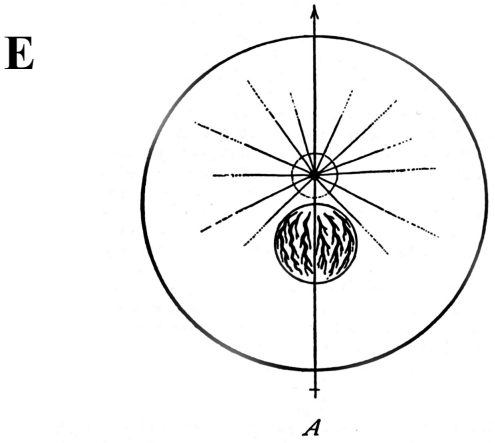


Figure 7.1. Diagram of van Beneden's, from Wilson (1896), to show the determination of cell polarity by the axis formed from a line through the centriole and the centre of the nucleus.

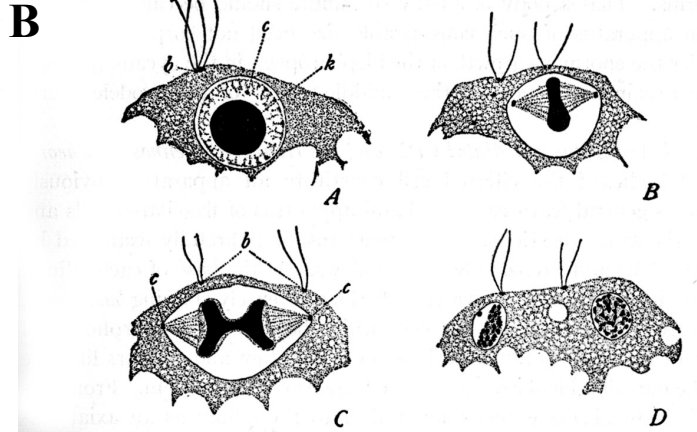


Fig. 341.—Blepharoplast (basal granule) and centriole in the flagellate *Colloclityon* (BĚLÁŘ). A, vegetative nucleus, with karyosome (*k*), centriole (*c*), and blepharoplasts (*b*); B, metaphase with intra-nuclear spindle; C, anaphase figure; D, telophase.

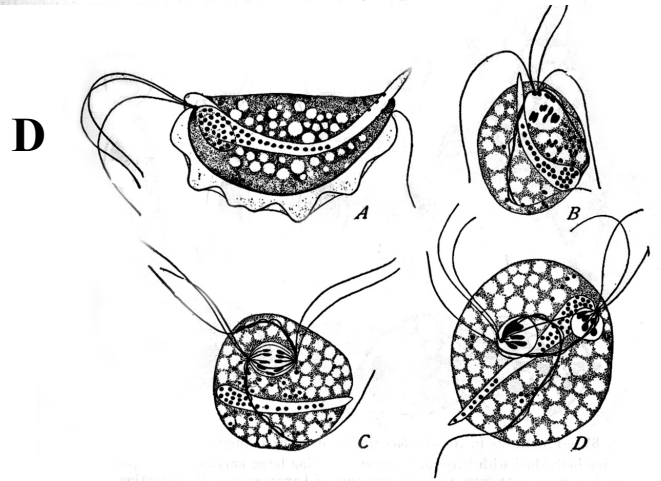


Fig. 86.—Mitosis in the flagellate *Trichomonas* (KOPID and SWEZY). A, vegetative individual (trophozoite); B, same, blepharoplast (*b*) divided; C, early anaphase; D, telophase.

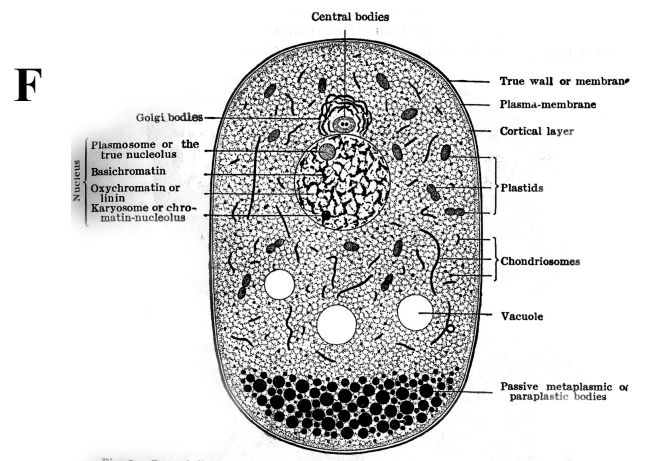


Fig. 6.—General diagram of a cell. Its cytoplasmic basis is shown as a granular meshwork or framework in which are suspended various differentiated granules, fibrillae and other formed components.

**Figure 7 : Le paradigme de le Théorie Lehnossek-Henneguy. Les contradictions au début du vingtième siècle.**

A: Observation illustrant la Théorie Lehnossek-Henneguy B: Une mitose dans laquelle les corps basaux ne sont pas associés aux pôles (noter que les pôles sont appelés centrioles, alors que le corpuscule qu'on appelle aujourd'hui centriole reste dans ce cas à la base des flagelles, mais reste relié au pôle par des fibres contractiles) C: Parthénogenèse et cytasters D: Les corps basaux sont aux pôles E: La polarité cellulaire vue par Wilson en 1896 F: La cellule vue par Wilson en 1925. Le corpuscule central est moins voyant...et n'est même plus au centre.

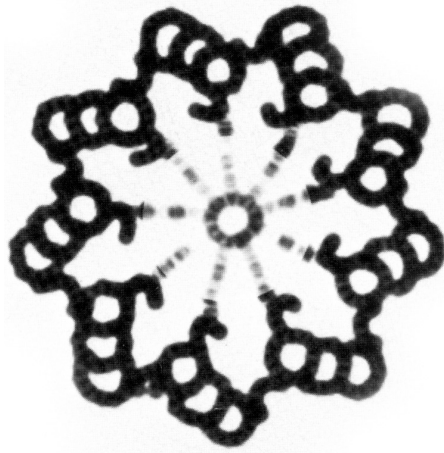
centrosomes en mitose (T. Boveri, 1901 et 1914 : « le problème de la tumeur est d'origine cellulaire », cité par W.L. Lingle et J.L. Salisbury, 2001).

La thèse de van Beneden et Boveri domine au début du siècle, mais un certain nombre de travaux tendent vers une autre voie de recherche (discuté dans Mazia, 1961) : Strasburger ne trouve pas de centrosome dans les cellules de plante et en vient à proposer une autre fonction (1897), toujours liée à une notion de 'dynamique cellulaire', mais différemment. Au lieu de nier l'importance du centrosome, il remarque que d'autres types cellulaires n'ont pas de centrosome et qu'ils ont en commun avec les plantes de ne pas se déplacer, et en particulier ne forment pas de flagelles (le mouvement amiboïde, trop lent était mal évalué). Il propose que le centrosome ait pour fonction soit de produire les flagelles soit de les faire bouger. Surviennent alors les travaux de Hennebury sur les epitheliums ciliés (1898) puis de von Lenhossék sur les spermatozoïdes de Bombyx (1898,1899) qui permettent d'assimiler le centrosome et le 'corps basal' des spermatocytes ou des cils d'épithélium. Ces auteurs observèrent en effet la migration de corpuscules correspondant aux centrosomes, du centre de la cellule vers sa périphérie, à l'emplacement où se formeront des flagelles ou des cils. Zimmermann (1928) généralisa cette fonction centrosomienne à tous les types cellulaires, y compris amiboïdes, donnant naissance à l'idée, continuellement débattue depuis, d'une fonction du centrosome dans le mouvement cellulaire.

La découverte de la parthénogenèse (clivage et développement de l'ovocyte sans fertilisation, Loeb, 1913 ; Delage et Goldsmith, 1913) vint faire planer un doute quant à la généralité des observations de Boveri (en fait, quand il fut découvert un peu plus tard, que le centrosome pouvait déclencher un développement parthénogénétique, sa théorie fut remise sur le devant de la scène).

L'accumulation de contradictions apparentes fit douter le platonicien qu'était Wilson de l'importance du centrosome dans sa cellule idéale et l'amènèrent, dans la dernière édition de





'Twinkle, twinkle, little star,  
How I wonder what you are!  
Jane Taylor (1783–1827)

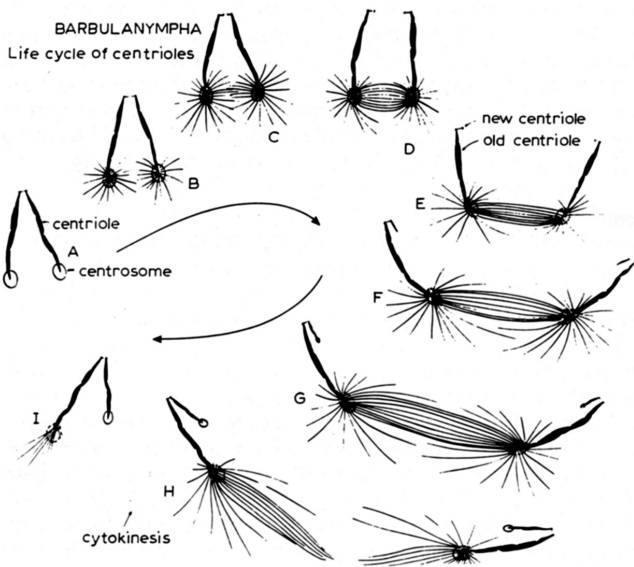
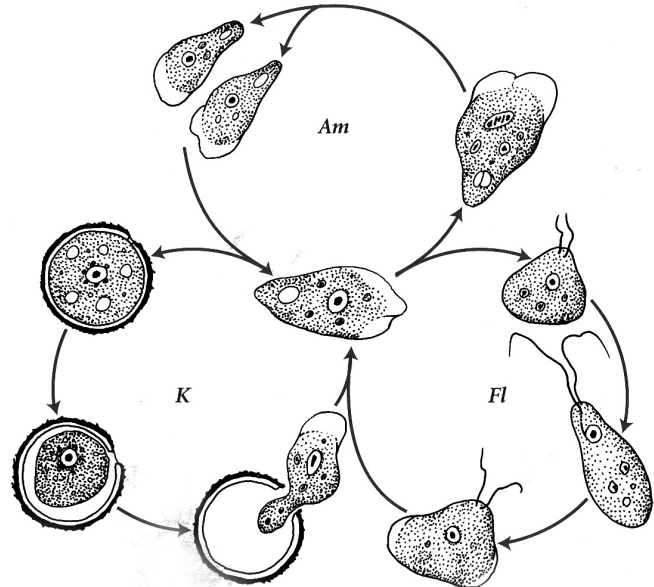


Figure 2.11. Unusual form of centriole found in the protozoan, *Barbulanympa*, with its cycle during the life cycle of the cell. From Cleveland (1963) by permission of the author and Academic Press.



Cycles vitaux de *Naegleria* (*Am*: amibe; *Fl*: forme flagellée; *K*: kiste). L'amibe n'a aucune sorte de centrosome. La forme flagellée possède des centrioles

### Figure 8 : La fascination pour la structure centriolaire. La diversité des centrosomes

La coupe transversale de centriole et la légende constituent le frontispice de *The Centriole* (Wheatley, 1982). Les centrioles sont retrouvés à l'identique dans tous les règnes du vivant. Quelques espèces ont des corpuscules fusoriaux un peu exotiques (les long centrioles de *Barbulonympa*, en bas à gauche, *ibidem*). Et certaines espèces ne possèdent des centrioles que dans leur forme flagellée (*Naegleria*, en bas à droite, tiré de Lecointre et Le Guyader, *Classification phylogénétique du vivant*, 2001).

son œuvre maîtresse, à réduire la place qu'il lui avait faite (d'après Wheatley). Finalement ces controverses, au lieu de dynamiser la recherche sur le centrosome, reléguèrent pendant une trentaine d'année cet organite au rang d'objet cellulaire de seconde importance et parfois même de simple artefact de fixation. On ne s'intéressera plus alors qu'au corps basal des flagelles ou des cils, seules raisons d'être des centrioles (Fürst 1898, et surtout Fry qui impose cette théorie en 1929, cités par C. Fulton, 1971) : tous les organismes qui ont des centrioles forment à un moment ou à un autre des cils ou des flagelles et les organismes qui n'ont habituellement pas de centriole en rassemblent un s'il leur arrive de fabriquer des cils ou des flagelles (cette théorie a une valeur très générale, voir la partie phylogénie).

### **3. Ultra structure : les centrioles au secours des centrosomes**

#### **- Le centriole**

L'observation à l'aide du microscope électronique, dans les années cinquante, de structures cylindriques exceptionnellement régulières et conservées d'une espèce à l'autre, au sein des centrosomes en interphase et aux pôles du fuseau mitotique, mis un point d'arrêt à la question du statut artefactuel du centrosome, sans toutefois régler la question de sa définition et de sa fonction. En effet, la période de presque trente années qui suivit la découverte de ce qu'on appelle aujourd'hui les centrioles (d'abord décrits comme corps basaux dans les épithéliums ciliés par Fawcett et Porter en 1954, puis au sein des centrosomes de mammifère en 1956 par Bernhard et de Harven), fut principalement descriptive, la plupart des publications étant fondées sur des études en microscopie électronique. Le centriole est décrit sous toutes ses coutures. On le retrouve dans tous les règnes du vivant, sauf chez les procaryotes.



Il reste cependant des zones d'ombre et des confusions dues à l'approche difficile que représente la microscopie électronique : on risque de manquer de recul et de se laisser noyer dans les détails (détails qui, aujourd'hui pourraient reprendre cependant toute leur valeur s'ils étaient recompilés dans un format accessible, car on n'entreprend plus aujourd'hui d'analyse aussi exhaustive et qui couvre un aussi grand nombre de systèmes biologiques, les publications étant dominées par un certain nombre de 'systèmes modèles' bien caractérisés). Ainsi, quand on ne voit pas un centriole, on craint qu'il ne soit tout simplement dans un autre plan de coupe, ce qui permet toujours à certains de douter de son absence et perturbe les analyses comparatives. On décrit aussi des asters sans corpuscule central (Moy et al., 1977), des centrosomes ne contenant pas de centrioles (Cleveland, 1963), et encore une fois les platoniciens sont bouleversés.

Le centriole est si répandu, qu'on ne peut plus ignorer son importance, même si certains continuent à penser qu'il n'est peut-être qu'une relique sans utilité, car sa fonction reste toujours aussi peu claire : rôle dans la division cellulaire ? Rôle dans la motilité ? Les exemples et contre-exemples sont nombreux, venant d'espèces plus ou moins exotiques (*Barbulonympha* par Cleveland, 1954 ; ou *Sciara* par Phillips, 1967 ; cités par D.N. Wheatley), mais très peu d'expériences directes sont réalisées. La théorie de Fry est confortée par la description de certaines espèces qui n'ont pas de flagelle lors de leur cycle végétatif mais qui peuvent en fabriquer transitoirement pour donner naissance à une cellule flagellée : la forme sans flagelle n'a pas de centriole, la forme flagellée en possède (chez certaines plantes, Mizukami and Gall, 1966 ; ou chez les amiboflagellés comme *Naegleria*, Fulton, 1971). L'idée que le centriole n'est pas nécessaire à la division se repend, car de nombreux cas de fuseaux sont décrits auxquels les centrioles ne semblent pas participer directement : ils se tiennent à proximité des pôles, mais en restent bien distincts (c'est fréquent chez les protistes).

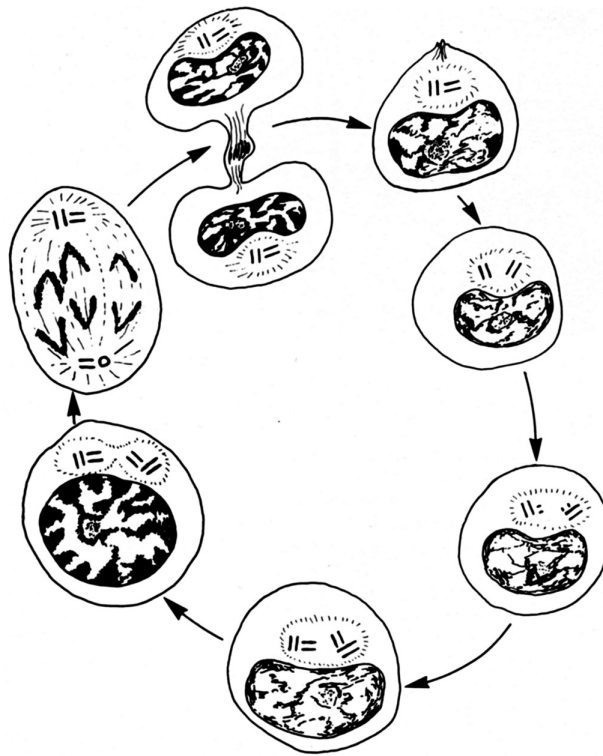


Figure 4.2. An idealised diagram describing the centriole cycle as found in mammalian cells, such as those analysed by Robbins et al. (1968) and Erlandson and de Harven (1971). For a much more elaborate presentation of these cyclical events, the reader is directed to the drawings of Vorobyev and Chentsov (1978b). The process of procectriole maturation from the short form to parental size is shown above as being complete by  $G_2$ , but the text describes cases in which this maturation may not be over until after the cell has passed into the next cycle.

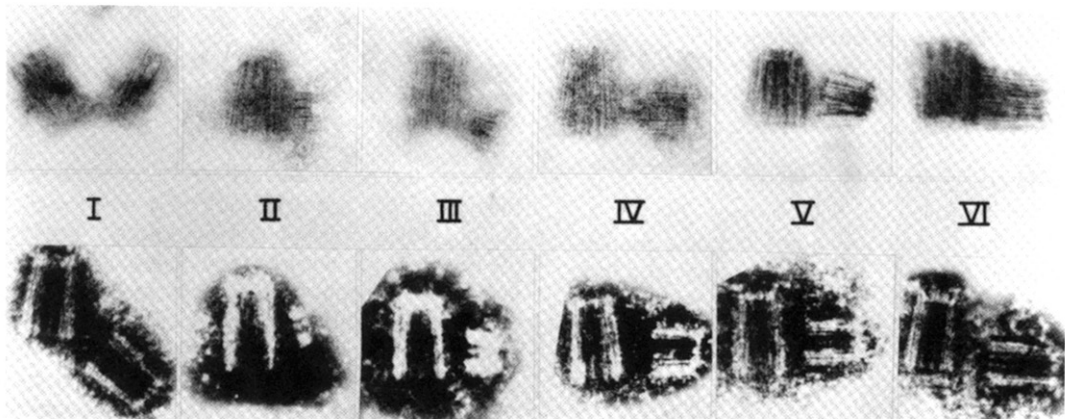


FIGURE 4 Electron micrographs of whole-mount preparations of centrioles, placed into six categories. Upper row: centrioles attached to the nucleus; lower row: centrioles freed from the nucleus. Category I represents centriole pairs in late M or  $G_1$ . The parent is full-size, and the daughter is also full-size, or nearly so, but not in an orthogonal orientation. Categories II, III, IV, V, and VI represent stages in the elongation of the daughter centrioles and correspond to ratios of daughter-to-parent centriole length of 0.0-0.2, 0.2-0.4, 0.4-0.6, 0.6-0.8, and 0.8-1.0, respectively.

## Figure 9 : Le cycle de duplication du centrosome

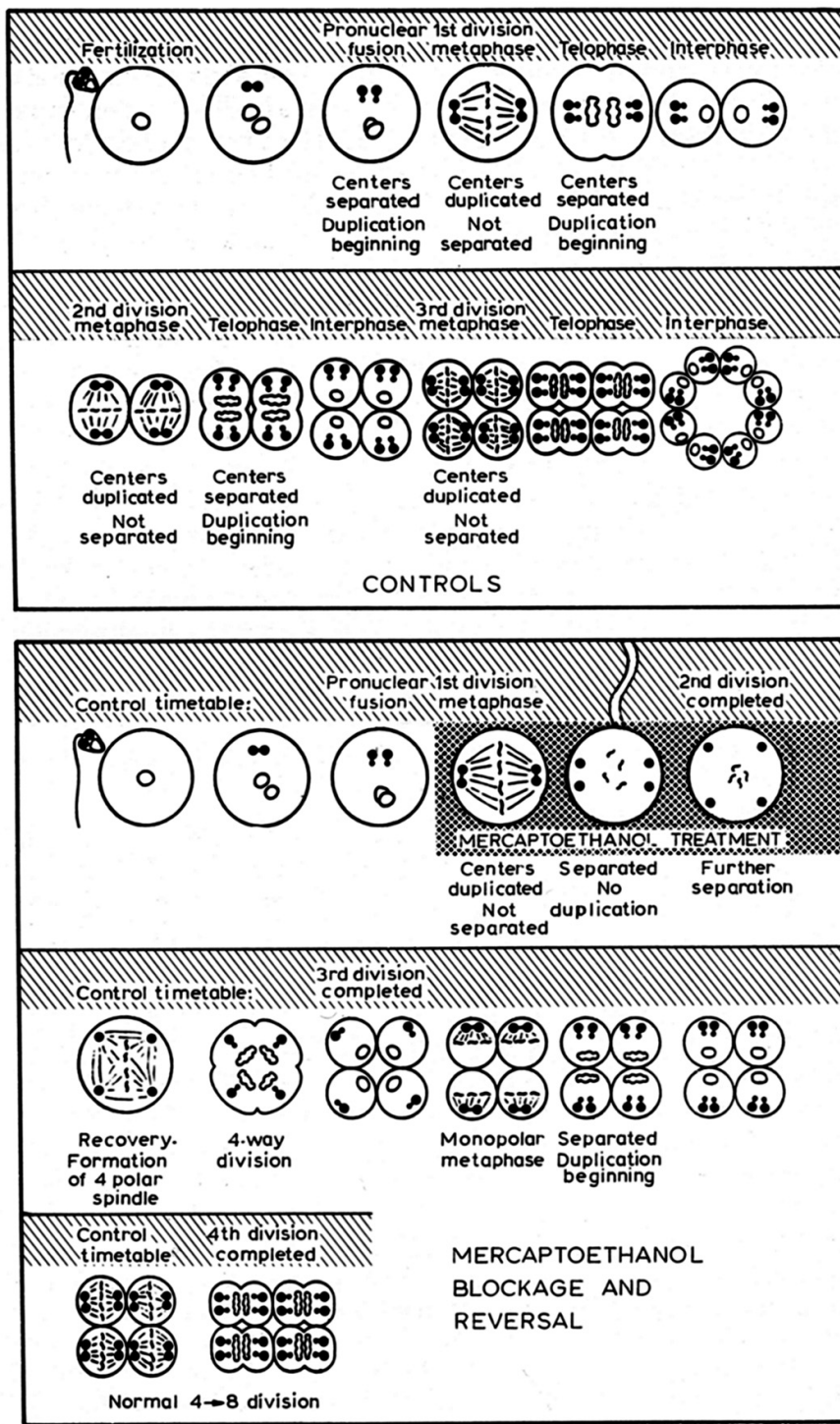
Un schéma de Wheatley en 1982 d'après les observations de Vorobjev et Chentsov.

Images de Kuriyama et Borisy (1981) montrant les centrioles de cellules synchronisées (I: sortie de mitose, II: début de S, III: S, IV: fin de S, V:  $G_2$ , VI: mitose), et utilisant la technique du whole-mount.

## **- La reproduction du centrosome**

Le cycle de duplication du centrosome est très minutieusement décrit (Gall, 1961), en partie grâce à de nouvelles techniques de synchronisation des cellules (Kuriyama and Borisy, 1981a), avec sa particularité étrange du bourgeonnement orthogonal des centrioles et de leur réplication semi-conservative. Le mode d'assemblage '*de novo*' est aussi décrit avec précision (Stockinger and Cireli, 1965; Dirksen and Crocker, 1966). La question de la possibilité de formation de centrioles '*de novo*' dans différents types de cellules est très débattue et on admet en général qu'elle n'est pas possible dans les cellules somatiques des métazoaires, hormis les cellules ciliées. Les expériences publiées par Zorn et al. en 1979 (Zorn et al., 1979) qui suggèrent la néo-formation de centrioles dans des caryoplastes (cellules obtenues par centrifugation et dépourvues de centrosome) n'ont jamais été confirmées et restent sujettes à caution.

La découverte du système de réplication de l'ADN, semi-conservatif comme celui du centrosome et de l'hérédité cytoplasmique des mitochondries et des chloroplastes, lance une course à la recherche d'un ADN centriolaire (discutée 'à chaud' par Fulton, pp 182-187 et 200-204, et par D.N. Wheatley, pp104-107), donnant lieu à un grand nombre de publications dès le début des années 1960 et jusqu'en 1990 date à laquelle la découverte du 'Saint-Graal' - nom donné à l'ADN centriolaire par W.F. Marshall et J.L. Rosenbaum dans leur reconstitution de cette épopée, (chapitre 8 du dernier volume sur le centrosome, 2001) – annoncée un an plus tôt (Hall et al., 1989) est définitivement remise aux calendes (Johnson and Rosenbaum, 1990). On peut reconstituer les principaux épisodes de cette quête : certaines études suggèrent l'existence d'ADN dans des préparations de corps basaux de ciliés (Seaman, 1960). Mais il y a un problème de contamination qui sera mis en évidence assez rapidement (Flavell and Jones, 1971). D'autres techniques sont utilisées et dès le début des années 1970,

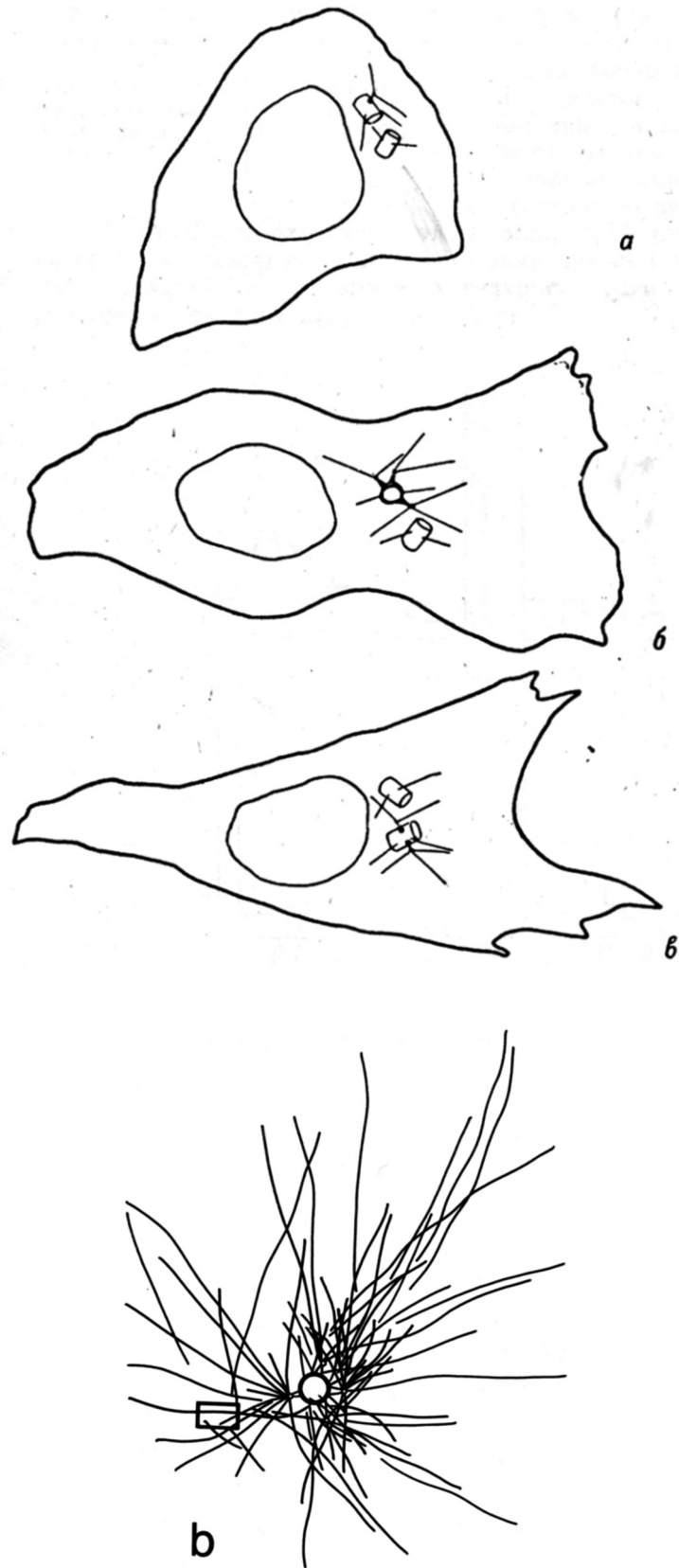


**Figure 10 : Le 'polar organizer'. Expériences de D.Mazia (1960)**

Chaque pôle comprend deux 'polar organizers' associés qui peuvent se séparer si la mitose est prolongée par un traitement au mercaptoéthanol. Aussi longtemps que le mercaptoéthanol est présent, la mitose est bloquée et les 'polar organizers' ne se dupliquent pas. Quand la drogue est retirée, la mitose se produit puis les polar organizers se dupliquent, mais, à la mitose suivante, il ne se forme qu'un fuseau monopolaire et la cellule sort de mitose sans se diviser. Les 'polar organizers' se redupliquent au cours de la phase S suivante et on se retrouve dans la situation contrôle (mais avec les problèmes d'aneuploïdie remarqués par Boveri pour la polyspermie, à cause de la mitose tétrapolaire pendant laquelle les chromosomes se sont répartis aléatoirement). Expériences réalisées sur des ovocytes d'oursin.

il est clair qu'il n'y a pas d'ADN dans les corps basaux des ciliés. La question rebondit néanmoins chez les mammifères avec l'observation de marqueurs d'acides nucléiques au niveau des centrosomes (McGill et al., 1976). Mais la technique utilisée n'est pas spécifique de l'ADN et il semble assez rapidement évident qu'en fait c'est de l'ARN qui a été détecté. De nombreuses études démontrent par la suite grâce à des centrosomes isolés traités par divers agents affectant l'ADN ou l'ARN, que ni l'ADN ni l'ARN n'ont de fonction dans la nucléation des microtubules (dans des systèmes allant du SPB des levures, Hyams, 1978, au NAB de *Dictyostelium Discoideum*, Kuriyama, 1984). L'ADN et l'ARN n'ont pas non plus d'importance dans la capacité parthénogénétique des centrosomes (Klotz et al., 1990). Sans oublier qu'il avait été montré bien plus tôt que dans certaines cellules, un blocage de la synthèse d'ADN n'empêchait pas la duplication des centrosomes de se poursuivre (Rattner and Phillips, 1973). Il semblait donc peut probable qu'il existe un ADN centriolaire guidant la genèse de cet organite. Pourtant, à la fin des années 80, la polémique est remise en train par l'identification d'ADN au niveau des corps basaux des flagelles de spermatozoïde (Dadoune et al., 1987), découverte qui semblait déjà largement contredite par de nombreuses publications antérieures et qui fut rapidement remise en question. C'est aussi à cette époque que se joue le dernier acte de ce drame : la génétique avait son mot à dire. Ainsi, dans le système génétique d'étude des centrioles, l'algue verte *Chlamydomonas Reihnardtii*, furent découverts une série de mutations affectant les centrioles. Or les gènes correspondant à ces mutations semblaient tous appartenir à un même ADN circulaire formant un nouveau 'linkage groupe' (comme l'ADN des mitochondries). Une étude d'hybridation *in situ* qui affirmait localiser cet ADN au niveau des corps basaux fut publiée en 1989 (Hall et al., 1989). Un an plus tard, l'existence d'ADN dans les corps basaux fut contredite (Johnson and Rosenbaum, 1990) et dans les quelques années qui suivirent, toute l'histoire s'effondra, car les gènes mutants affectant les centrioles se trouvèrent avoir été mal localisés, plusieurs d'entre eux





**Figure 11 : Les analyses fines du centrosome/MTOC en microscopie électronique**

Le schéma du haut est tiré d'un article de Vorobjev et Chentsov (*Tsitologia*, 1983), celui du bas de Alieva et al. dans *The Centrosome* (1992). Ils montrent clairement l'ancrage préférentiel des microtubules sur les appendices du centriole parental (à comparer au modèle du papier 1).

appartenant en fait à d'autres 'linkage groupes', ce qui du même coup remis en question l'existence d'un fragment de génome circulaire.

Depuis le sujet est clos et la question de l'importance des ARNs centrosomiens reste ouverte (Heidemann et al., 1977). Elle est peu travaillée dans la mesure où la destruction de l'ARN centriolaire n'affecte pas les fonctions de centrosomes isolés.

Dés les années 50-60 les ovocytes constituent le système qui permet de faire progresser la question de la reproduction des centrosomes et quelques expériences qui resteront des références sont réalisées à cette époque (Mazia et al., 1960). Elles ouvrent la voie à l'investigation des relations entre cycle de division cellulaire et cycle de duplication du centrosome.

Par ailleurs, une approche de destruction du centrosome par microchirurgie laser est développée par Berns (Berns et al., 1969, Berns et al., 1977; Berns and Richardson, 1977), mais elle rencontre de nombreuses critiques quant à sa spécificité. Elle ne deviendra un outil efficace et reconnu que vingt ans plus tard grâce aux améliorations apportées par A.Khodjakov et Conly Rieder (Khodjakov et al., 1997). D'une manière générale, les outils font toujours défaut pour étudier le centrosome (pas de drogues, pas de mutants).

#### **4. Les microtubules et le MTOC**

Avec la découverte des microtubules au niveau ultrastructural et leur caractérisation biochimique (pour une revue voir Desai and Mitchison, 1997), un nouveau paradigme se dessine pour la fonction du centrosome : le centrosome est le lieu de naissance des microtubules (fonction reconnue dès le début des études en microscopie électronique). En effet, bien qu'il n'ait pas encore été prouvé à la fin des années 70 que les centrioles sont faits

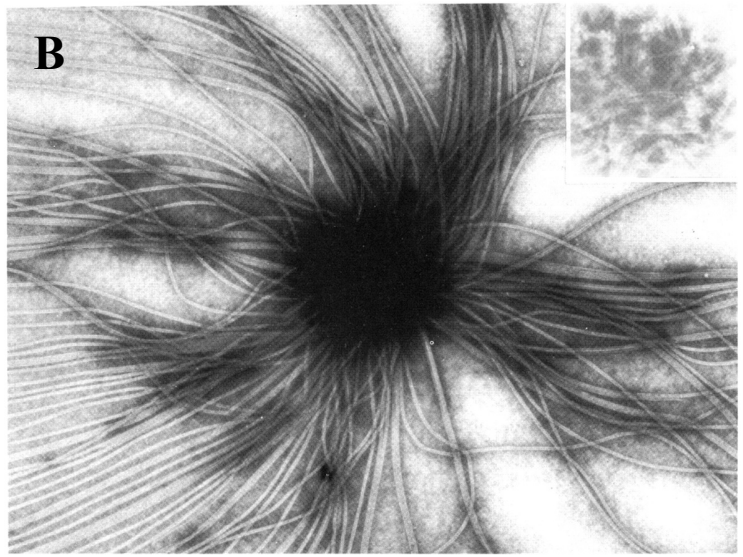
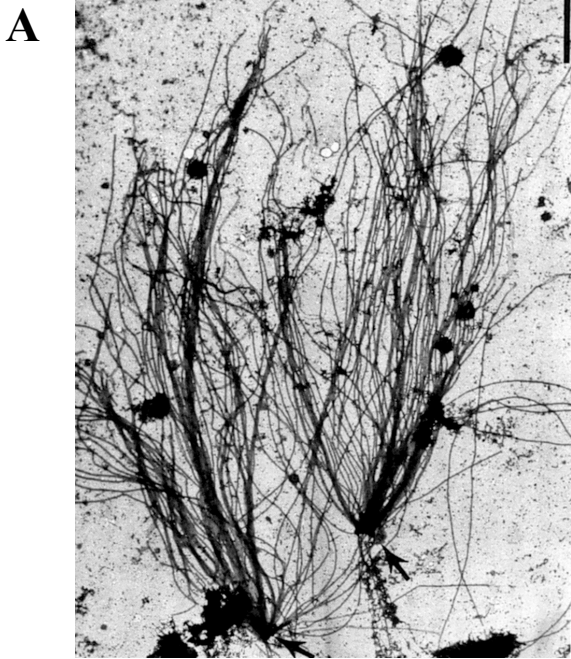
de microtubules, la ressemblance de leurs tubules avec ceux des microtubules suggère rapidement cette propriété (Dustin, 1978, il est amusant de noter que la plupart des arguments rapportés dans le livre de Wheatley, à part l'argument morphologiques sont très faibles voire faux). Elle sera démontrée peu de temps après et fera naître l'idée, aujourd'hui considérée comme généralement fausse, que les tubules des centrioles peuvent servir à nucléer les microtubules des asters, comme les corps basaux nucléent les tubules des axonèmes. Cependant, l'idée du centrosome comme nucléateur des microtubules est née. La volonté de trouver un terme générique désignant les corpuscules aux structures variées qui ont la propriété de nucléer des microtubules amène Pickett-Heaps (Pickett-Heaps, 1969) à proposer l'appellation MTOC (pour microtubule organising center) appelé à effacer toutes les autres au prétexte que cette fonction commune est plus importante que la diversité ultrastructurale. La propriété de nucléation de microtubules attribuée au centrosome fut démontrée directement par de nombreuses expériences de nucléation 'in vitro' (Weisenberg and Rosenfeld, 1975), rendues possibles par les premières techniques d'isolation de centrosomes. Elles permirent de localiser l'activité de nucléation au niveau du matériel péricentriolaire (Gould and Borisy, 1977), et de démontrer une variation du nombre de microtubules nucléés en fonction de la phase du cycle cellulaire (Snyder and McIntosh, 1975, Kuriyama and Borisy, 1981b). Ce genre d'étude appliquée aux cinétosomes (centrosomes associés à la base d'un axonème), démontra qu'ils pouvaient soit nucléer des microtubules dans le prolongement de leurs corps basaux (nom des centrioles dans les cinétosomes), soit former des aster selon les conditions d'expérimentation (Heidemann and Kirschner, 1975, Kuriyama and Kanatani, 1981), ce qui confirma l'identité centrosome/cinétosome. Des expériences de nucléation *in vitro* furent aussi effectuées sur toutes sortes de MTOC, dont le SPB des levures (Byers et al., 1978, Hyams and Borisy, 1978).

C'est à la fin des années 70 que commence à se faire fortement ressentir le besoin d'une analyse moléculaire du centrosome et donc de son isolement, pour avoir accès à sa génétique, et pour pouvoir le visualiser sans avoir à recourir au microscope électronique (grâce aux nouvelles techniques d'immuno-marquage). Mais à cette époque, les microtubules, qui sont de mieux en mieux compris grâce à la découverte de leur polarité (Allen and Borisy, 1974, Borisy, 1978, Summers and Kirschner, 1979), de leurs propriétés dynamiques intrinsèques (Mitchison and Kirschner, 1984a; Mitchison and Kirschner, 1984b) et de leurs fonctions multiples dans l'organisation cellulaire, sont très attractifs. Dans ce contexte, le centrosome devient pour beaucoup avant tout le MTOC, on ne l'étudie pas vraiment directement faute de technique adéquate et il reste le parent pauvre de ce champ en pleine expansion qu'est l'étude du cytosquelette.

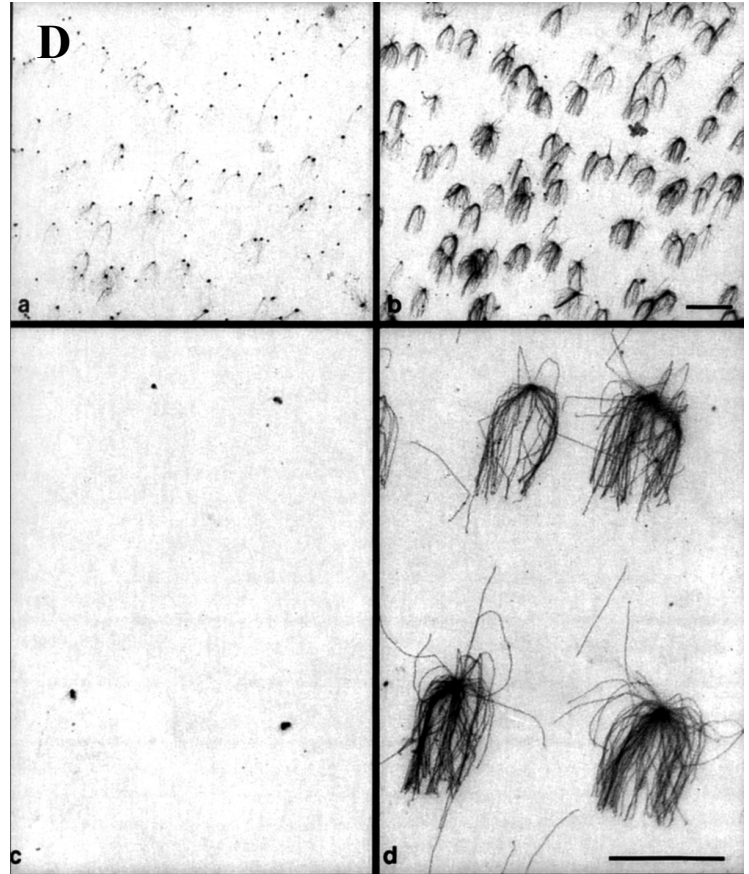
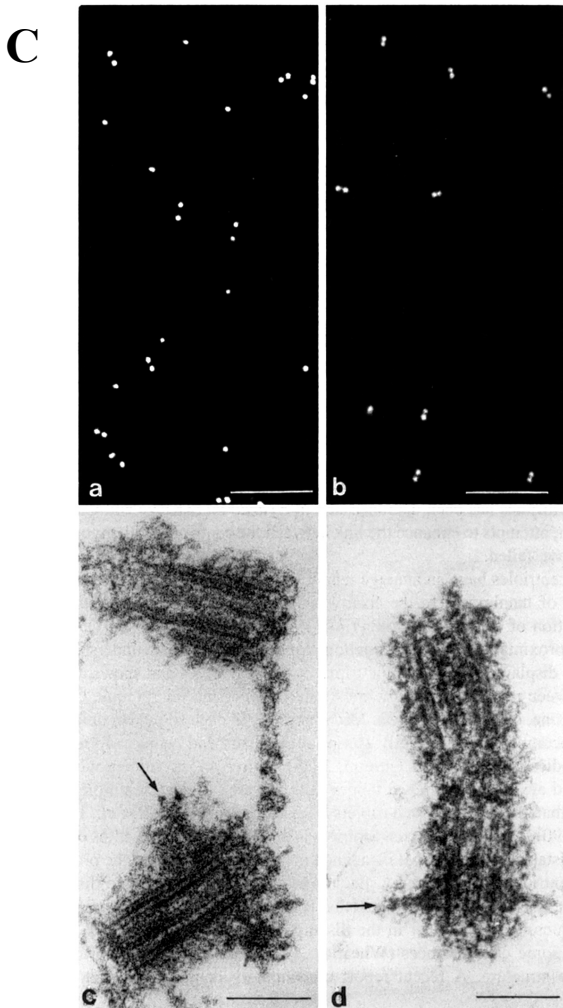
## **5. Le centrosome moléculaire, première partie : purification et anticorps**

### **- Le centrosome isolé**

A la fin des années 70, les premières techniques d'isolement de centrosomes sont développées dans des systèmes variés (des ciliés aux levures) et servent tout d'abord à tester leur capacité de nucléation dans de la tubuline purifiée. Elles permirent aussi de démontrer clairement la capacité du centrosome purifié à provoquer le développement parthénogénétique du xénope lorsqu'il est injecté dans un ovocyte non fécondé (de manière amusante, l'importance du centriole a tout d'abord été supposée à partir d'études réalisées avec des corps basaux de flagellés, Heidemann and Kirschner, 1975).



**Fig. 4.** Centrosome-initiated microtubule assembly *in vitro*. A centrosome from colcemid-blocked mitotic Chinese hamster ovary cells after exogenous incubation with porcine brain tubulin *in vitro* showing microtubules polymerized at the centrosome. Over 125 microtubules emanate from the densely staining center. The stain conceals a centriole pair, shown at higher magnification and the same orientation in the inset.  $\times 20,000$ ; inset,  $\times 37,500$



**Fig. 5.** Isolated centrosomes nucleate microtubules from purified tubulin. Low (a,b) and high (c,d) magnification view of a nucleation experiment in which centrosomes were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 8 min with  $12\ \mu\text{M}$  tubulin (beef brain) purified on phosphocellulose. Nucleation was monitored by double immunofluorescence. The asters were visualized by an antitubulin antibody (b,d) and the centrosomes by the rabbit serum 0013 (a,c). This experiment shows the presence of a single centrosome in the center of each individual aster. Bars:  $10\ \mu\text{m}$ .

## Figure 12 : Le centrosome isolé

Expériences de nucléation *in vitro* sur des SPBs isolés de *S.cerevisiae* (A, Byers et al., 1978, Hyams et Boris, 1978), ou de cellules de hamster (B). Purification en masse de centrosomes fonctionnels (C et D, Bornens dans The Centrosome, 1991). A, B, C (bas) : microscopie électronique. C (haut), D : immunofluorescence.

Les méthodes de purification initiales ne permettent cependant pas de produire des centrosomes en quantité suffisante ni suffisamment purs. De nouvelles techniques de lyse des cellules et de fractionnement sont mises au point au début des années 80 (Mitchison and Kirschner, 1986). Ces techniques reposent souvent sur une propriété très générale découverte en 1977 (Bornens, 1977) : le centrosome est associé au noyau, plus ou moins fermement selon les espèces. Cette propriété reste valable pour des centrosomes dits 'acentriolaires' (le SPB des levures, le NAB de *Dyctiostelium Discoideum*) et se vérifie de manière caricaturale chez beaucoup d'unicellulaires ciliés ou flagellés qui sont munis de véritables 'racines' reliant le corps basal au noyau. Il fallait donc, pour pouvoir purifier des centrosomes, trouver un moyen de dissocier le centrosome du noyau. Les expériences d'énucléations rapportées par Porter (Veomett et al., 1974) donnent un indice pour les cellules de vertébré : il faut désassembler le cytosquelette d'actine puis séparer les fractions lourdes contenant les noyaux et les fractions contenant les centrosomes, ce qui peut être réalisé par centrifugation sur des gradients de densité. Une pureté suffisante est alors atteinte pour produire, par exemple, des anticorps monoclonaux (voir pour une revue le chapitre de R. Kuriyama dans *The Centrosome*, 1991) mais aussi pour réaliser des analyses sur gel d'acrylamide. Ces anticorps ont été des outils précieux, mais les protéines qu'ils reconnaissent ont souvent été difficiles à caractériser et à séquencer, car les protéines strictement centrosomiennes sont en général peu abondantes et leurs ARNm sont rares. Ainsi, le grand espoir qu'avait porté la purification du centrosome et qui a fait des années 80 la période la plus riche en expériences fondamentales sur cet organe, s'éteint quelque peu au début des années 90 et le centrosome retourne dans l'ombre. On évite à nouveau ce corpuscule pudiquement voilé par la luxuriance d'un aster de microtubules. L'emploi de plus en plus systématique du terme MTOC révèle cette arrière-pensée : cachez ce centrosome que je ne saurais voir.

### **- La définition moléculaire du centrosome : les anticorps**

La production d'anticorps, ou leur purification à partir de sérums non-immuns ou auto-immuns (Connolly and Kalnins, 1978), qui permis la localisation des protéines associées au centrosome, fit surgir une question cruciale : où s'arrête le centrosome ? (voir la revue de R. Kuriyama dans *The Centrosome*, 1991 et Sellitto et al., 1992). En effet, de nombreux anticorps qui reconnaissent des protéines localisées à proximité de cet organelle sans membrane révèlent des réseaux qui s'étendent jusqu'à l'appareil de Golgi (Nigg et al., 1985). Ces anticorps permirent aussi d'établir différentes catégories de protéines centrosomales : celles qui sont au centrosome en mitose aussi bien qu'en interphase (Maunoury, 1978), celles qui au contraire n'y sont localisées qu'à une phase particulière du cycle de division cellulaire et qui en général se concentrent aux pôles en mitose mais sont absentes du centrosome interphasique. Certaines passent du centrosome en interphase au fuseau en mitose puis au pont cytoplasmique qui relie les cellules filles à la fin de la cytokinèse (Sellitto and Kuriyama, 1988). Comme d'habitude, les enthousiastes peuvent y voir le signe d'une fonction particulière du centrosome, haut lieu de rencontre des protéines liées au cycle de division cellulaire, quand les prudents préfèrent s'en tenir aux hypothèses minimales du type 'passenger protein' : la protéine va au centrosome pour être distribuée équitablement entre les cellules filles ou bien au pont cytoplasmique pour être finalement éliminée quand celui-ci se rompt.

Il y a aussi des protéines qui se dispersent dès que les microtubules sont désassemblés, d'autres qui restent et qui cèdent plus ou moins facilement à l'extraction par des détergents ou des sels, d'autres encore qui existent à l'état soluble dans le cytoplasme et sont simplement plus concentrées au niveau du centrosome - leur activité dépend-elle de leur localisation ? - et enfin certaines qu'on ne peut révéler sur un gel d'acrylamide qu'à condition de charger la piste avec des centrosomes purifiés (un extrait total de cellules ne révélant aucune bande

tellement la proportion de cette protéine est faible). Tous ces renseignements se sont révélés extrêmement précieux pour affiner la définition du centrosome, organe à la frontière floue ; en continuité avec le cytoplasme.

## **6. La définition des systèmes modèles et des grands thèmes de recherche**

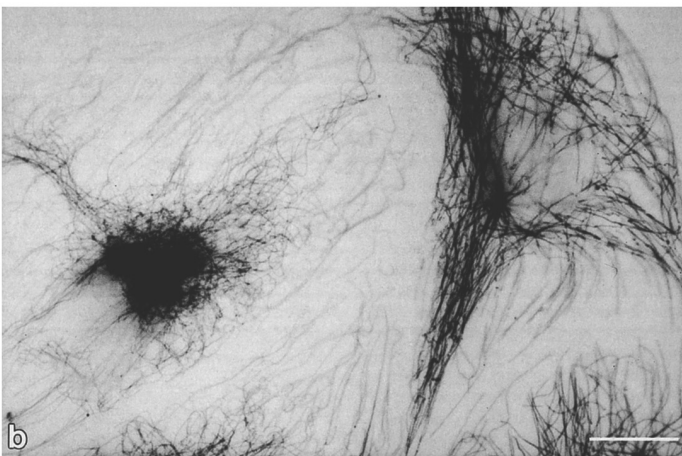
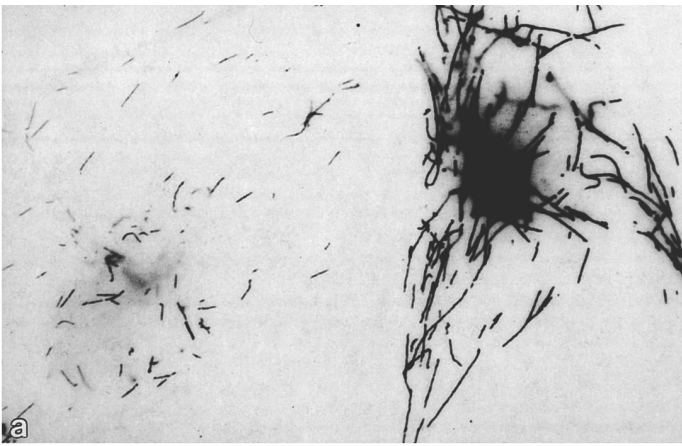
C'est aussi au cours des années 80 que se dessinent petit à petit les systèmes modèles et les thèmes de recherches qui seront développés au cours des vingt années suivantes pour finalement constituer les paradigmes contemporains. La plupart des attributs qui caractérisent encore aujourd'hui le centrosome sont définis entre 1980 et 1985.

### **- le centrosome nucléateur et organisateur des microtubules (MTOC)**

La purification des centrosomes a permis une étude *in vitro* non seulement du centrosome en temps que nucléateur des microtubules (Weisenberg and Rosenfeld, 1975), mais aussi du processus de nucléation lui-même (en incubant les centrosomes avec des anticorps par exemple, Pepper and Brinkley, 1979) et de la polymérisation des microtubules (Mitchison and Kirschner, 1984b). L'utilisation de drogues qui affectent les microtubules (Watt and Harris, 1980 ; De Brabander et al., 1982) et d'anticorps dirigés contre la tubuline (Pepper and Brinkley, 1977), puis de tubuline fluorescente injectée dans les cellules (Soltys and Borisy, 1985, Schulze and Kirschner, 1986) furent dès le début des années 80 et jusqu'à aujourd'hui les principales techniques utilisées pour l'étude *in vivo* de ces mêmes processus. Ainsi ont été mises en évidence l'existence de microtubules non centrosomiens (Spiegelman et al., 1979) et les différences notables existant entre l'activité de nucléation du centrosome en interphase et en mitose. La microscopie électronique eut aussi son mot à dire : elle permit de déterminer la



A



**Fig. 2.** Microtubule turnover in PtK cells. Biotin-tubulin was injected into two adjacent PtK2 cells at, respectively, 4 minutes 51 seconds (left) and 4 minutes 42 seconds (right) prior to fixation at 30°C and processed for indirect immunofluorescence. Biotin-tubulin incorporation (a) and total tubulin (b) immunofluorescence are shown. Note the difference in incorporation between the two cells in culture. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

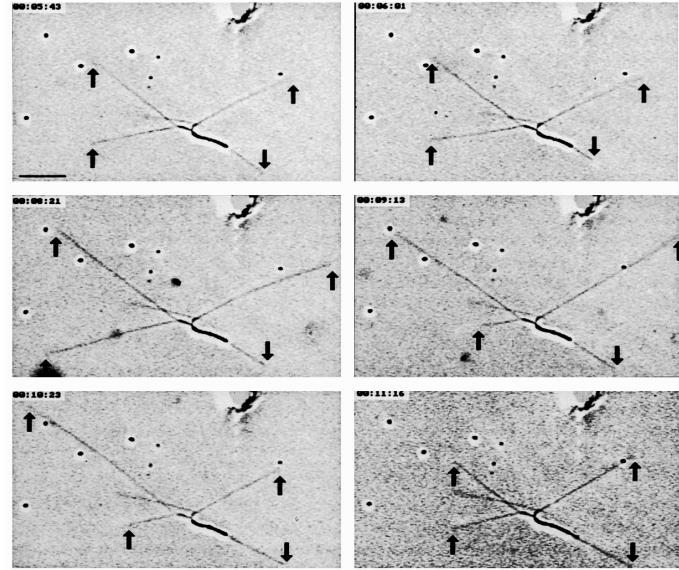
### Figure 13 : La dynamique des microtubules

**A:** Expérience d'injection de tubuline biotinilée.

En 5 minutes, la cellule de droite a renouvelé les microtubules au centre de l'aster alors que la cellule de gauche n'a incorporé de la tubuline qu'au bout de quelques microtubules. Cette technique rapportée ici par Wordeman et Mitchison dans *Microtubules* (1994) a été très utilisée pour estimer la dynamique des microtubules dans les cellules (la tubuline ne s'incorpore que dans les microtubules dynamiques, par exemple, les premiers : Margolis et Wilson en 1977 et 1978)

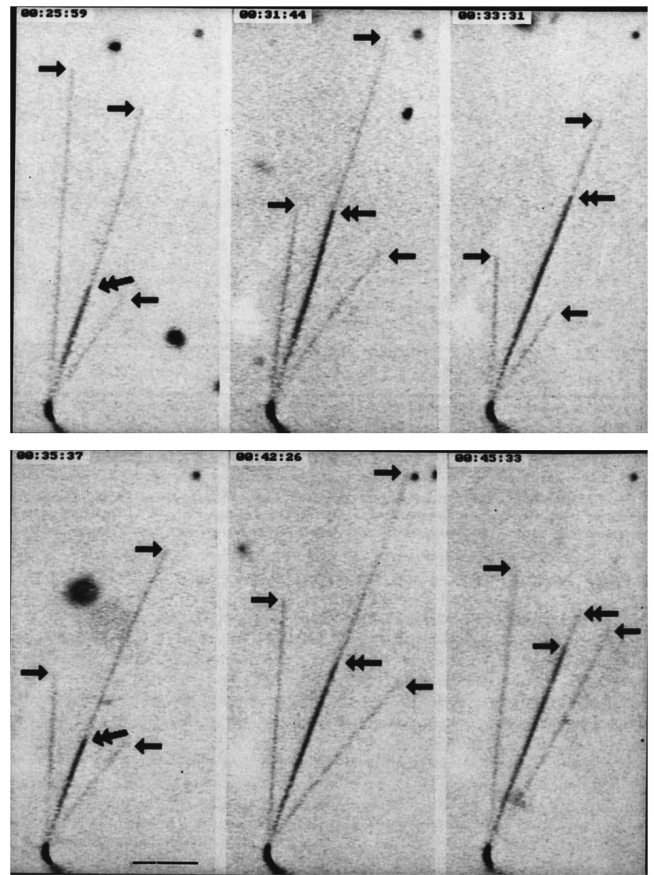
**B:** Une expérience qui montre la différence de dynamique entre le bout plus (qui correspond au bout distal de l'axonème) et le bout moins des microtubules. Rapportée par Bayley et al. dans *Microtubules* (1994). La technique du fond noir et des fragments d'axonème a permis pour la première fois d'observer les microtubules non fixés (Summers et al., 1979).

B



**Fig. 2.** Bipolar dynamic microtubule growth in vitro seeded from a *Chlamydomonas* axoneme. T-GTP (15  $\mu\text{M}$ ) incubated with a seed at 37–40°C, observed by video-enhanced dark-field microscopy at time = 5 minutes 43 seconds to 11 minutes 16 seconds. The two ends of the axoneme are distinguished by their morphology and the microtubule distribution. Both ends show dynamic transitions within this short time period. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

C



**Fig. 3.** Dynamic microtubule growth in vitro seeded from an axoneme of *Tetrahymena* cilia. T-GTP ( $\approx 25 \mu\text{M}$ ) incubated with a seed at 30°C, observed by video-enhanced dark-field microscopy at time = 25 minutes 59 seconds to 45 minutes 33 seconds. The four individual microtubules behave independently with unrelated periods of growth and shortening (see also Fig. 4). The more intense microtubule (end marked with a double-headed arrow) was resolvable earlier in the sequence, but having once aligned with its longer neighbor it remained so. At t = 45 minutes 33 seconds, this neighboring microtubule shortens past its growing end.

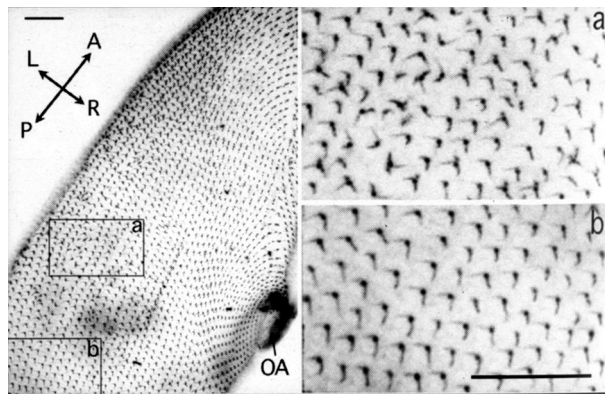
**C :** L'instabilité dynamique.

Elle a été correctement décrite et théorisée à partir des expériences de Mitchison et Kirschner (1984) sur des centrosomes isolés (et non pas des axonèmes comme montré ici, tiré de Bayley et al. dans *Microtubules*, 1994).

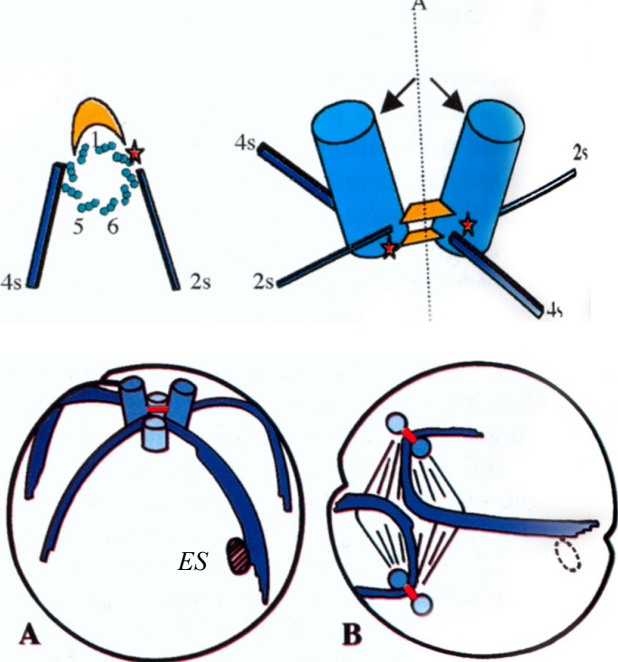
polarité des microtubules – définie d’abord par leur dynamique (Summers and Kirschner, 1979, Mitchison and Kirschner, 1984a) – dans différentes structures. Il fut démontré en particulier que l’aster centrosomien a une polarité bien définie, tous les bouts moins étant regroupés au centrosome (Bergen et al., 1980, Heidemann and McIntosh, 1980). La microscopie électronique permet aussi de mettre en évidence différentes régions du centrosome par rapport à leur propriété de nucléation et de proposer que le centrosome puisse nucléer des microtubules puis les relâcher (Vorobjev and Chentsov, 1982). Le centrosome est donc composé de sous-parties fonctionnelles qu’on arrive à dissocier : certaines parties ne contiennent pas de centriole, mais forment des MTOCs supplémentaires (Keryer et al., 1984). Il est aussi découvert qu’on peut assembler des asters sans centrosome en mitose, en abaissant la concentration critique de polymérisation de la tubuline, à l’aide du taxol par exemple (De Brabander et al., 1982). Il y a enfin à cette époque une tentative d’identifier les complexes protéiques importants pour la nucléation en fabriquant des anticorps contre des MTOC de toutes sortes (voir la revue de R.Kuriyama dans *The Centrosome*). La protéine qui est depuis considérée comme la protéine clé de la nucléation, la gamma-tubuline, fut finalement isolée en cherchant, lors d’un crible génétique, des suppresseurs d’une mutation de la  $\beta$ -tubuline qui rendait les microtubules plus stables (Oakley and Oakley, 1989).

A nouveau se pose le problème de la fonction des centrioles dans le centrosome, dans la mesure où ils ne semblent pas constituer la partie du centrosome qui sert à nucléer les microtubules. On a tendance à les concevoir comme des ‘passagers’ du centrosome qui seront utilisés si la cellule a besoin de fabriquer un cil ou un flagelle (discuté dans presque toutes les revues sur le centrosome de cette époque). Ce raisonnement prend appui sur l’idée qu’il y a une nécessité absolue de présence d’un centriole pour en faire un autre et donc qu’il faut les garder ‘au cas où’. Il est plus fréquent chez les protistologues qui étudient des cellules dans lesquelles un rôle peut être facilement attribué aux centrioles indépendamment de la mitose.

### A Paramécie



### B Chlamidomonas reinhardtii



### Fig 14 : Le corps basal

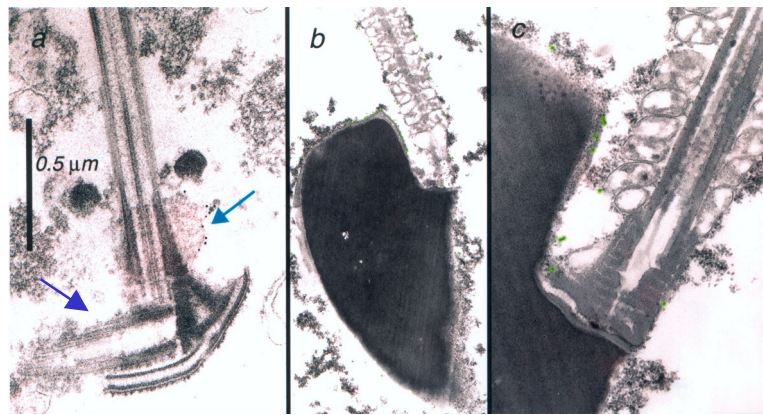
A : Le cortex d'une paramécie mutante (cro 1) qui a trop de corps basaux. Il ne peuvent pas tous s'aligner correctement (a), on voit sur les grossissements les fibres de microtubules associées aux corps basaux. Des perturbations du cortex obtenues par micromanipulation sont transmises sur des milliers de générations (Beisson et Jarkia-Dziadosz, *The Centrosome* 1999).

B: Le schéma montre les associations asymétriques de microtubules sur les corps basaux corrélées à des asymétries des centrioles qui permettent de numéroter les triplets, et les asymétries de l'organisation cellulaire qu'ils génèrent. Le rond en A représente le photorécepteur ou eye spot (*ES, ibidem*). B : mitose.

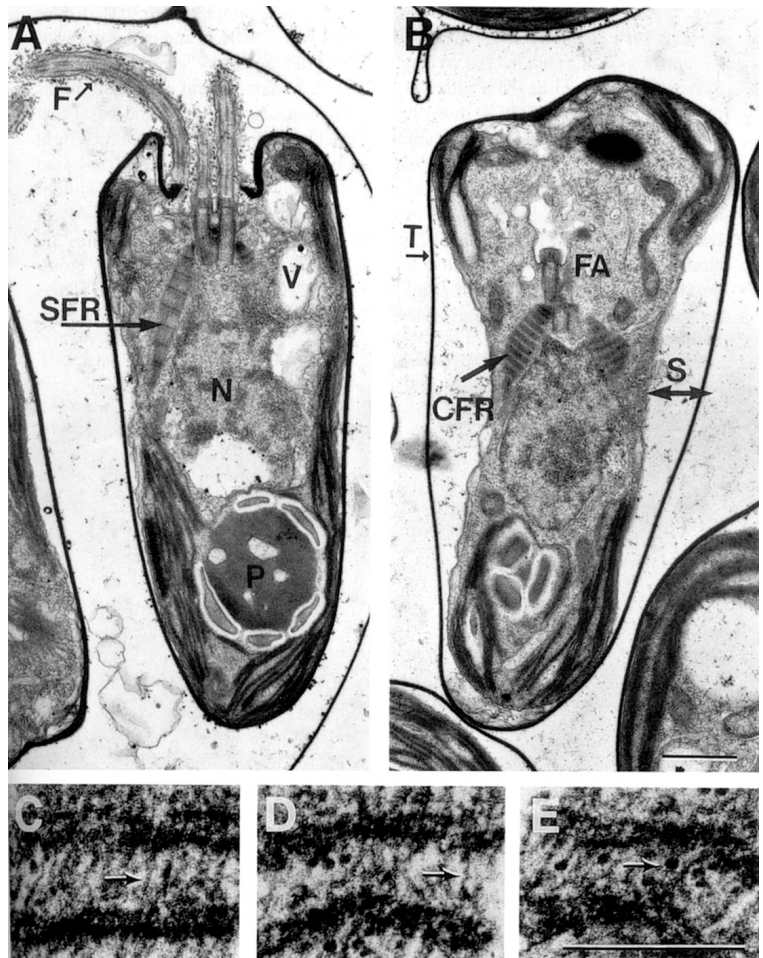
C: Une image en microscopie électronique de la base du flagelle d'un spermatozoïde de souris (Lechtreck et Smrzka, non publié). On peut encore apercevoir les deux centrioles dégénérés (flèches bleues).

D: La contraction des fibres de centrine SFR et CFR) reliant les corps basaux au noyau, qui produit une internalisation des corps basaux lors d'une réaction de protection de la cellule qui ferme complètement sa coque normalement ouverte pour laisser passer les flagelles (Baron et Salisbury, *The Centrosome* 1992)

### C Spermatozoïde de souris



### D Tetraselmis



De plus, des mutants dans lesquels les centrioles ne sont plus reliés aux pôles du fuseau continuent à se diviser, mais répartissent aléatoirement les centrioles dans les cellules filles, ce qui donne des cellules avec un nombre variable de flagelles (Wright et al., 1983; Wright et al., 1985). Mais il y a dans ce raisonnement une contradiction dans la mesure où de nombreuses cellules dépourvues de centrioles ne les rassemblent que quand elles fabriquent des cils ou des flagelles -donc sans présence préalable d'autres centrioles (par exemple, Fulton and Dingle, 1971), et cela dans les espèces les plus variées (plantes, divers unicellulaires). De plus, comme le précisent E. Karsenti et M. Bornens (1984), le statut des centrioles dans le centrosome est assez symétrique en interphase et en mitose : ils ne nucléent pas directement les microtubules et le centrosome serait donc un passager perpétuel de la cellule somatique qui n'assemble pas d'axonème. Si une fabrication '*de novo*' est possible dans autant d'espèces, pourquoi les métazoaires conserveraient-ils des centrioles dans des cellules dans lesquelles ils seraient de simples 'passagers' du centrosome ? On peut envisager deux hypothèses : soit les cellules *in vivo*, rassemblent des axonèmes plus souvent qu'on le pense (les cils primaires sont très répandus, même si leur fonction est presque toujours inconnue), soit les centrioles ont un rôle dans le centrosome, indépendamment de leur capacité à nucléer l'assemblage d'un axonème.

### **- Le corps basal**

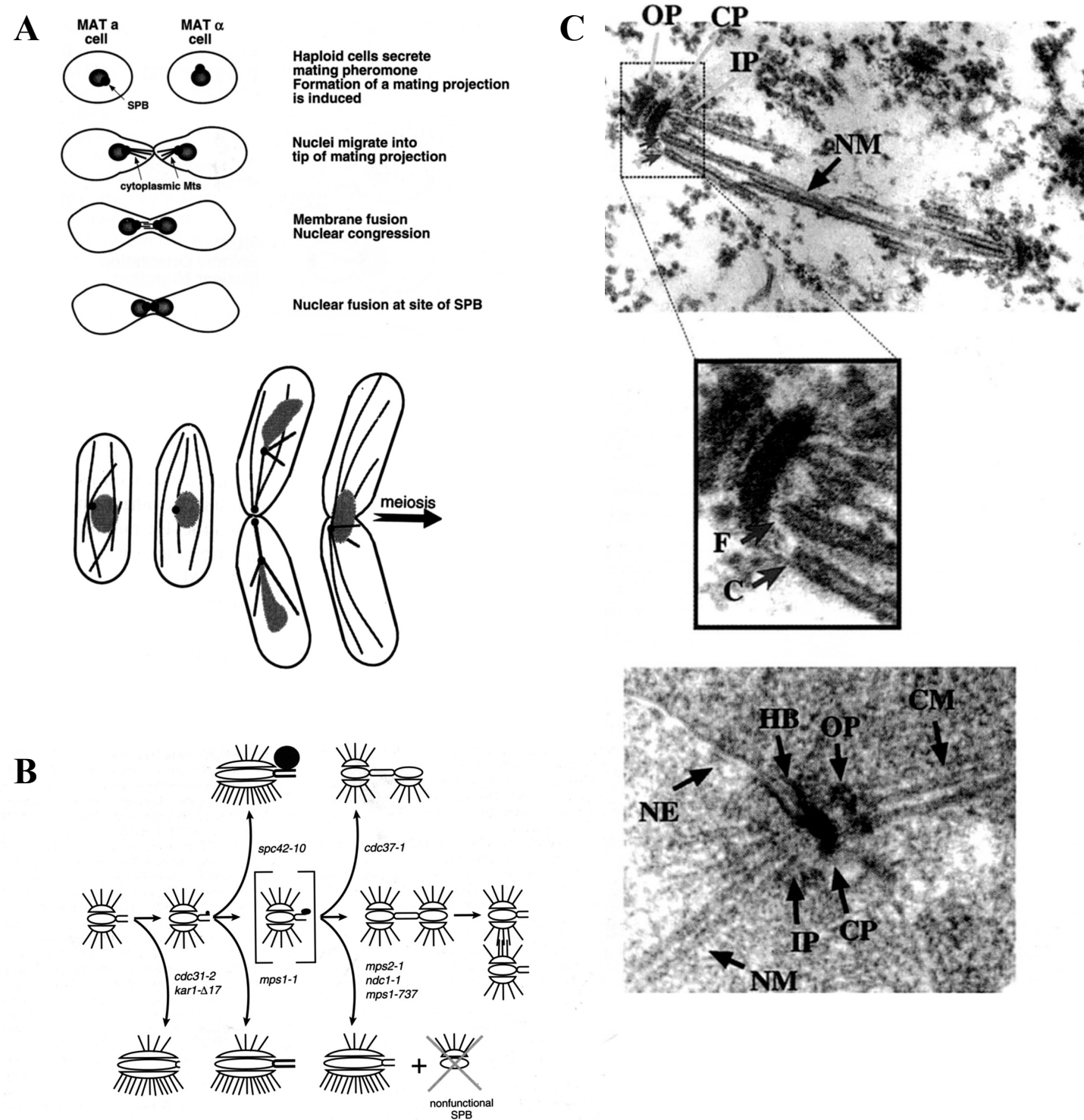
Les principaux modèles d'étude des corps basaux, centrioles localisés à la base des axonèmes, sont : les spermatozoïdes des métazoaires, *Chlamydomonas reinhardtii* (une algue verte unicellulaire biflagellée), Tetrahymena (un cilié) et la paramécie (un cilié). Les centrioles des unicellulaires ciliés et flagellés sont souvent associés à des fibres multiples, que l'on trouve plus rarement et moins développées dans les centrosomes de vertébrés. Ces fibres contiennent en grande quantité une protéine qui est commune à quasiment tous les



centrosomes et qui a constitué l'outil de base pour les travaux présentés dans cette thèse : la centrine (Salisbury et al., 1984).

Par ailleurs, l'étude en microscopie électronique des corps basaux des ciliés et des flagellés a permis de mettre en évidence des relations entre la génération du centriole, les symétries des structures qui lui sont associées et les différentes symétries de la cellule dans son ensemble (Beisson and Sonnenborn, 1965, Ng and Frankel, 1977, Holmes and Dutcher, 1989, et pour une revue voir Beisson and Jerka-Dziadosz, 1999), ce qui permet d'envisager que les symétries de cet organite puissent être utilisées pour la morphogenèse cellulaire. Un certain nombre de travaux proposent aussi un rôle du centriole dans la régulation du battement flagellaire et donc dans la directionnalité du mouvement des cellules, en particulier grâce à la contraction des fibres centriolaires (McFadden et al., 1987) en réponse à une augmentation de la concentration en calcium (Salisbury and Floyd, 1978, Wright et al., 1985). Enfin, l'étude de la spermatogenèse permet de mettre en évidence une série de remaniements des centrioles, qui sont parfois, comme dans les espèces murines, désassemblés dans le spermatozoïde mature (Woolley and Fawcett, 1973). Dans ce cas, ils ont donc un rôle restreint à l'assemblage de l'axonème. C'est un cas particulier qui a été très étudié, car en général c'est le centriole du spermatozoïde qui nucléé l'aster qui permet de réunir les deux pro-nuclei dans l'ovocyte fécondé (Schatten, 1982).

Le corps basal reste la seule structure centriolaire dont la fonction semble claire. Un autre argument va dans le sens d'une restriction de rôle du centriole à celui de corps basal potentiel: dans les levures, qui sont dépourvues de flagelles l'organite qui tient lieu de centrosome ne contient pas de centriole (argument utilisé aussi bien dans Fulton, 1971 que dans D.N. Wheatley, 1982).



**Fig 3.** The SPB duplication pathway in budding yeast showing the aberrant SPB morphologies associated with specific mutations (see text for details). The bracketed intermediate is postulated and would result from expansion of the satellite as a new SPB is made. Strains mutant in *CDC37* appear to block SPB duplication at the same step as *MPS2* or *NDC1*, but the SPB morphologies are distinct (Schutz et al, 1997). At the restrictive temperature, *cdc37* mutant strains arrest in G1 (Schutz et al, 1997), whereas the other mutant strains proceed through S-phase (see text).

### Figure 15 : Le SPB des levures

**A :** Le SPB et la karyogamie chez *S.cerevisiae* (haut, Vogel et Snyder, The Centrosome, 2001) et chez *S.pombe* (bas, Hagan et Petersen, The Centrosome, 2001).

**B :** Les mutants de duplication du SPB (Chial et Winey, The Centrosome, 1999)

**C :** L'ultrastructure du SPB (NE : nuclear envelopp, NM nuclear microtubules, OP : outer plaque, IP : inner plaque, CP : central plaque, HB : half bridge; Knop et al., The Centrosome, 1999)

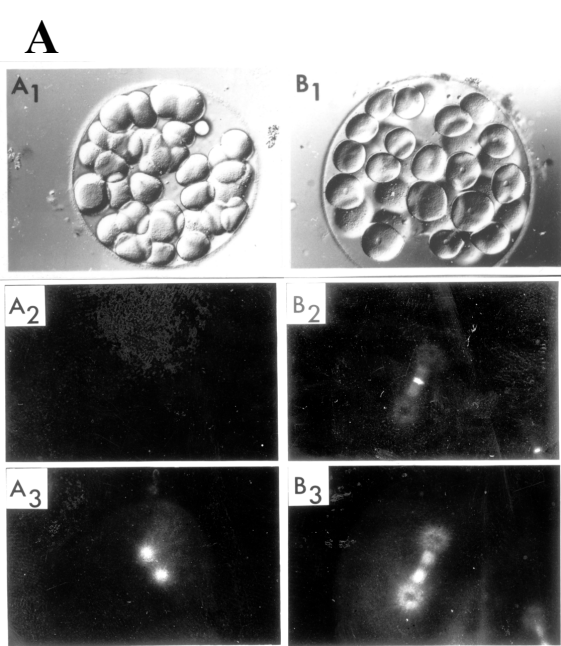
### **- Le centrosome des levures (SPB)**

L'organisme qui a fait avancer à pas de géant l'analyse moléculaire dans tous les domaines, grâce à des outils génétiques bien huilés, a aussi été une source précieuse d'information en ce qui concerne le centrosome. Le corpuscule fusorial de la levure *Sacharomices cerevisiae* est caractérisé dans les années 70 (Robinow and Marak, 1966). Il est proposé qu'il soit un dérivé acentriolaire du centrosome des vertébrés (Hartwell, 1974). Le corpuscule fusorial (ou SPB pour spindle pole body) des levures *Sacharomyces cerevisiae* et *Schizosacharomyces pombe* apparaît, en microscopie électronique, composé d'une alternance de régions denses et de régions moins denses aux électrons (après fixation et marquage aux métaux lourds). Contrairement aux centrioles, il est inséré dans la membrane nucléaire (en mitose seulement pour pombe). Pendant longtemps très peu d'homologues des protéines du SPB ont été identifiées dans d'autres organismes (à part la centrine, Huang et al., 1988, appelée cdc 31 chez la levure Baum et al., 1986). Cependant, un certain nombre de caractéristiques et de fonctions sont communes à cet organite et au centrosome centriolaire: nucléation et ancrage des microtubules, rôle dans la formation du fuseau, duplication une fois par cycle, association au noyau. Ces homologies fonctionnelles ont à la fois apporté plus de force aux hypothèses avancées pour les fonctions possibles du centrosome dans les autres organismes et ont justifié l'espoir de découvrir des homologies moléculaires (voir la revue de M. Winey dans The Centrosome).

### **- Le centrosome et la mitose**

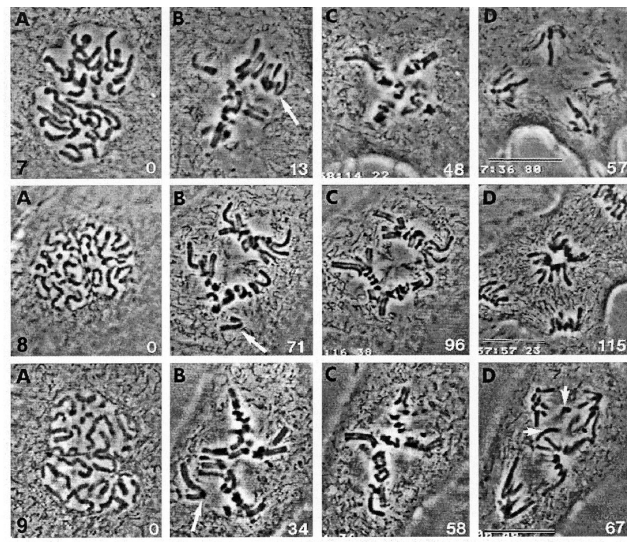
Le centrosome a-t-il un rôle dans la mitose ? La réponse, qui est sans ambiguïté chez *cerevisiae* où les microtubules sont strictement associés au SPB, est l'objet d'une controverse ancienne. Le point de vue de Boveri est conforté par plusieurs expériences qui montrent que l'injection d'un centrosome isolé dans un ovocyte de xénope suffit à déclencher un





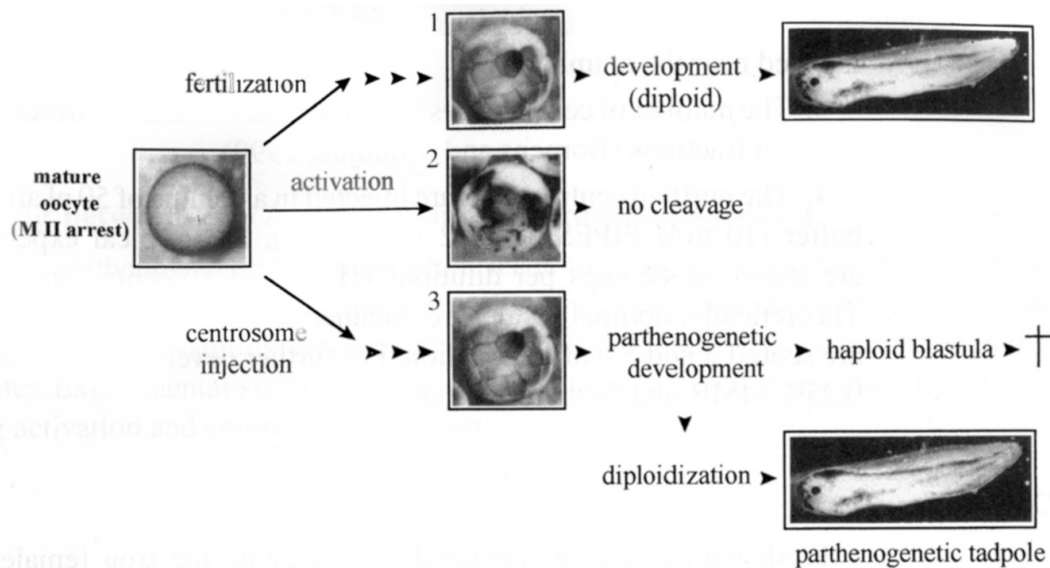
C

**Fig. 7.** Binucleated PtK cells progressing through a tetrapolar mitosis. (A) NEB. (B) Prometaphase. In this cell the last monooriented chromosome, marked by the arrow, initiated congression 16 minutes after this picture (29 minutes after frame A). (C) Anaphase onset 43 minutes after the last monooriented chromosome became biooriented. (D) Telophase. No chromatids were stranded between the poles during anaphase. Minutes after first frame shown at lower right corner of each frame. Phase contrast optics. Bar, 20  $\mu$ m.



**Fig. 8.** Binucleated PtK cells progressing through a tetrapolar mitosis. (A) Just prior to NEB. (B) The last monooriented chromosome (arrow) has become biooriented. (C) Anaphase onset 96 minutes after NEB. (D) Telophase. This tetrapolar cell entered anaphase 25 minutes after the last monooriented chromosome initiated congression. No chromatids are stranded between the poles during anaphase. Minutes after first frame shown at lower right corner of each frame. Phase contrast optics. Bar, 20  $\mu$ m.

B



**Fig. 1** Fertilization and normal development, egg activation, and centrosome-induced parthenogenetic development in *Xenopus*. (1) Mature oocytes are blocked in metaphase of the second meiotic division. Fertilization restores diploidy and triggers development. (2) Resumption of the cell cycle can be triggered by pricking the oocyte with a glass needle, leading to sequential embryonic cell cycles, to cytoplasmic reorganization as shown by the displacement of cortical pigment, but not to egg cleavage. (3) Cleavage can be restored if a centrosome is injected into the egg cytoplasm at the pricking step. This leads to the parthenogenetic development of haploid embryos until the gastrula stage. Haploid embryos display atypical gastrulation and developmental arrest, leading to embryonic death. Diploidization may occur in an erratic way during the first mitotic cell cycle,

### Figure 16 : Centrosome et mitose

**A** : Parthénogenèse artificielle dans le xénope par injection d'un centrosome humain (figure de Tournier et Bornens, dans Centrosomes and Spindle Pole Bodies, 2001; papiers originaux: Picard et al., 1987 et Tournier et al. 1989).

**B** : Des embryons d'échinoderme sans noyau se divisent normalement pendant quelques cycles pourvu qu'ils aient un centrosome (duplication de l'ADN bloquée dans Nagano et al., 1981, et ablation de la vésicule germinative ou des deux pro-nuclei dans Picard et al., 1988, figure de Picard et al.).

**C** : Fuseaux multipolaires dans des cellules PtK binucléées. Il n'y a pas de contrôle du nombre de centrosome dans la cellule à l'entrée en mitose (Sluder et al., 1997).

développement parthénogénétique. Dans un ovocyte privé de son noyau, le centrosome seul provoque l'assemblage de structures microtubulaires bipolaires en mitose et la division des blastomères, ce dont est incapable un noyau privé de centrosomes (l'ADN assemble un fuseau mais ne provoque pas la division des blastomères), renforçant l'idée d'un centrosome 'organe de division ' (Nagano et al., 1981, Picard et al., 1988, et voir la revue de D. Glover dans The Centrosome). Les toutes premières divisions de l'embryon constituent le système privilégié pour les recherches sur cette question: on retire l'ADN ou les centrosomes des ovocytes par micromanipulation, on injecte ces même éléments séparément ou ensemble (Karsenti et al., 1984a; Karsenti et al., 1984b; Tournier et al., 1989). La purification améliorée de centrosomes permet de raffiner les expériences de parthénogenèse chez le xénope et de montrer que l'injection des seuls centrioles restaure la capacité parthénogénétique, pourvu que leur structure soit intacte (Klotz et al., 1990). On s'interroge toujours cependant sur le mécanisme lié à ce rôle en mitose. En effet, il ne semble pas que le centrosome soit nécessaire à l'assemblage ni à la stabilité du fuseau métaphasique dans certains ovocytes (en méiose, Szollosi et al., 1972) mais aussi dans les premiers stades du développement des souris (Calarco-Gillam et al., 1983) ou dans certaines cellules somatiques (cellules sans centrioles issues de mutants, Szollosi et al., 1986, dissociation des centrioles et des pôles sous l'action de drogues, Heidemann et al., 1980, Wright and Moisan, 1982). Encore une fois, tout dépend du système choisi : dans les embryons d'échinodermes pas de fuseau sans centrosome (Sluder and Rieder, 1985b), mais dans les cellules somatiques de *Drosophila melanogaster*, un fuseau s'assemble (Szollosi et al., 1986). Ces deux exemples ne sont pas choisis au hasard : l'accumulation de données dans les systèmes les plus variés ne s'accompagne pas d'un effort de synthèse qui tente de bien discerner les différences qui existent entre les différents systèmes expérimentaux, au mieux l'opinion qui s'exprime dans les revues cache mal une certaine perplexité, et on se contente d'énumérer les variantes possibles ; au pire, on se

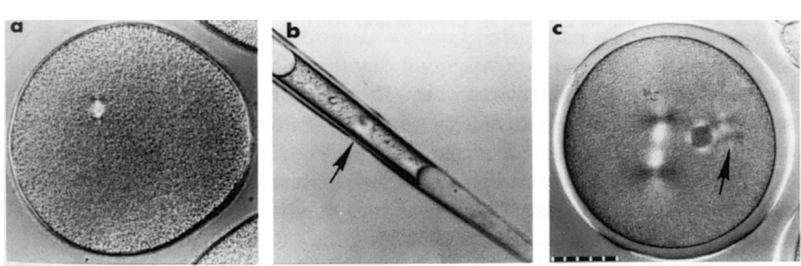
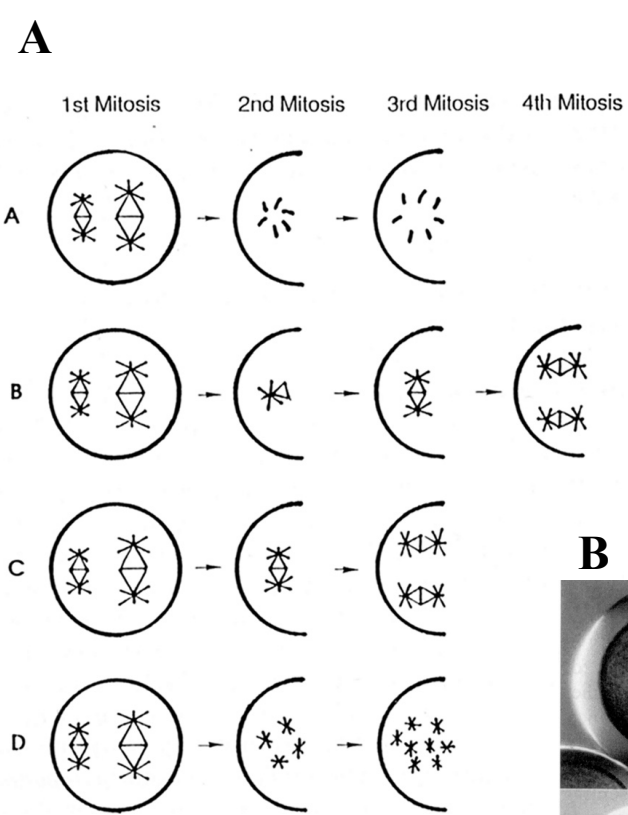


convainc que le centrosome ne sert à rien, car on peut toujours trouver un exemple où l'on peut s'en passer.

Un point de consensus apparaît néanmoins : le nombre de centrosomes présent influence le plus souvent la figure mitotique observée. Quand un centrosome est présent, le nombre de pôles correspond au nombre de centrosomes. Les expériences les plus marquantes sont celles qui mettent en évidence un lien entre un problème de duplication ou de séparation des centrosomes et la formation de fuseaux monopolaires (Wang et al., 1983; Andersson et al., 1981). On observe aussi des fuseaux multipolaires dans les cellules qui contiennent plus de deux centrosomes, ce qui est en particulier le cas de nombreuses cellules cancéreuses (Nowell, 1976, malgré quelques exceptions de cellules qui forment des fuseau bipolaires avec de nombreux centrosomes aux pôles, qui peuvent être expliquées par l'adaptation des cellules cancéreuses à un nombre trop grand de centrosome, Ring et al., 1982). Ainsi la figure 'par défaut' (en l'absence de centrosome) est un fuseau bipolaire, mais le centrosome 'domine' (un anachronisme : Heald et al., 1997), d'où le caractère central de la question du contrôle du nombre de centrosomes assemblés lors d'un cycle de division cellulaire.

#### **- Le centrosome et le cycle de division cellulaire (ovocytes d'échinodermes et d'amphibiens)**

Cette question donnera lieu à de nombreuses publications et son principal artisan dans les années 1980 fut G. Sluder (voir sa revue dans *The Centrosome*) dont le travail se situe dans le prolongement de celui de D. Mazia. Il utilisa préférentiellement le développement précoce des échinodermes qui se prêtent bien à une analyse en lumière polarisée (les asters apparaissent très clairement comme des croix) et permettent donc une analyse *in vivo* des événements liés à la mitose. De plus, ils se prêtent bien aux expériences de micromanipulation (les ovocytes



**Fig. 4.** Transfer of a meiosis I spindle from a newly fertilized egg into a zygote in first mitosis. (a) The meiotic spindle is seen in bright contrast at the upper surface of the egg. (b) This spindle has been aspirated into a micropipette and capped with oil. The spindle is indicated by the arrow. (c) The meiotic spindle after it has been microinjected into a zygote; for this particular trial, the recipient is a sea urchin zygote. The larger mitotic spindle is to the left of the transferred spindle (arrow). The spherical inclusions are oil droplets expelled from the micropipette. Polarization microscopy. 10  $\mu$ m per scale division.

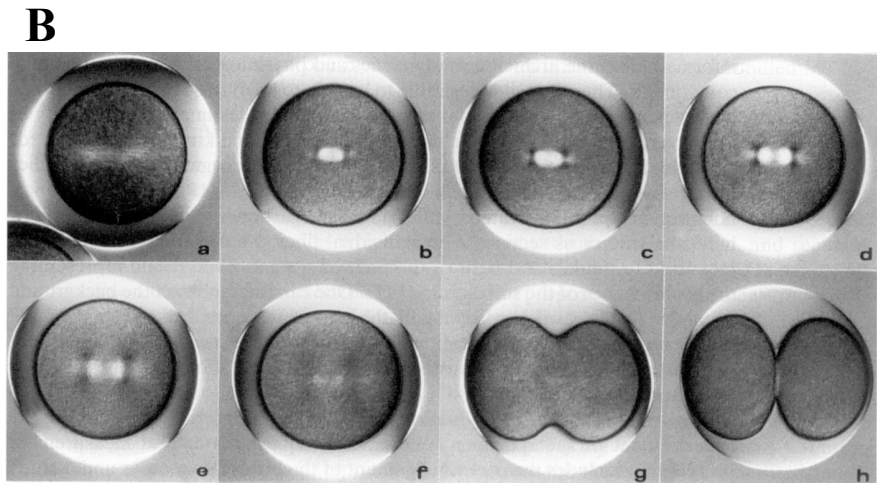
**Fig 17 : Le centrosome et le cycle cellulaire. Le modèle des ovocytes d'oursin.**

**A :** Des expériences de transfert de fuseaux méiotiques d'un ovocyte qui vient d'être fécondé dans un zygote mitotique (l'image de droite montre le protocole expérimental). Le résultat des expériences est schématisé à gauche. Le fuseau méiotique est plus petit que le mitotique. Les différents cas de développement observés sont schématisés (Sluder, dans *The Centrosome*, 1992)

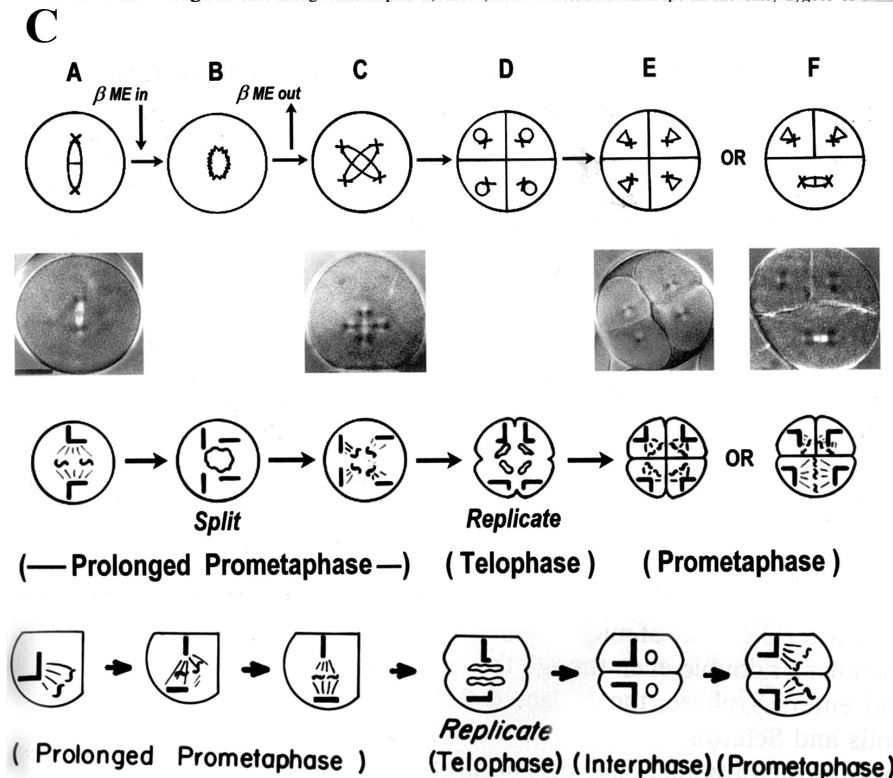
**B :** Première division, observée en lumière polarisée (Sluder et al, *Mitosis and Meiosis*, 1999)

**C :** Les expériences de Mazia revues par Sluder, avec une variante pour le devenir des cellules contenant des fuseaux monopolaires ( $\beta$ ME :  $\beta$ -mercaptoéthanol, sert à prolonger la prometaphase, ce qui entraîne

la séparation des centrioles aux pôles et la formation de deux fois plus de pôles lorsque la drogue est retirée).



**Fig. 11** Birefringence of spindle, asters, and fertilization envelope in the early zygote of a sea urchin.

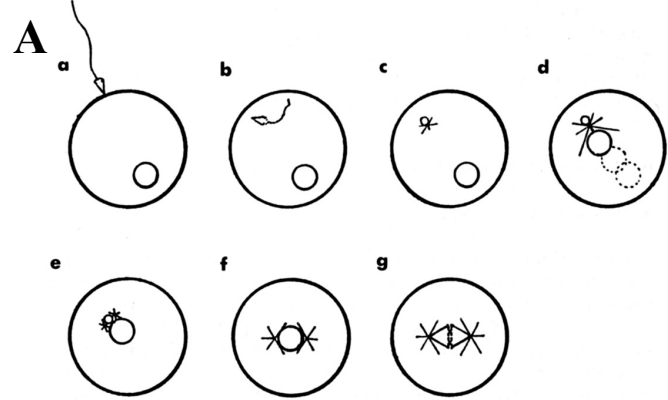


sont gros, on peut même transférer un fuseau d'un ovocyte dans un autre). Enfin, les gamètes de ces animaux peuvent s'obtenir en grand nombre et sont faciles à cultiver (eau de mer).

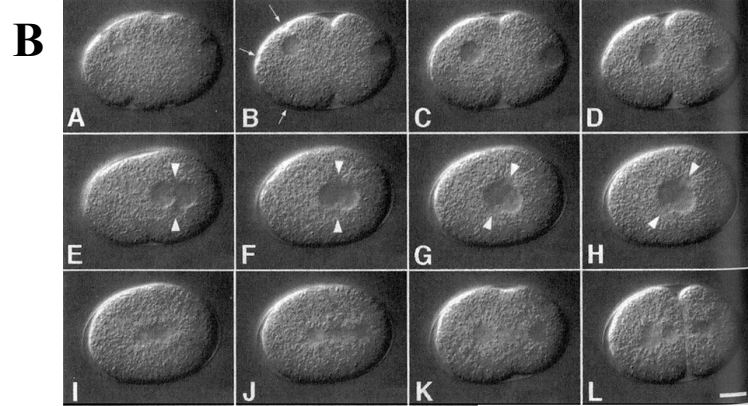
G. Sluder reprit et développa la théorie du 'polar organiser' (Mazia et al., 1960), un complexe moléculaire qui ne serait pas équivalent au centriole mais se trouverait associé à lui dans la plupart des cas. Cette entité conceptuelle définie par sa capacité à assembler un pôle et à se dupliquer une fois par cycle de cellulaire est présente en deux exemplaires à chaque pôle (Mazia et al., 1960 et Sluder and Begg, 1985) et permet d'ignorer la controverse dans laquelle sont pris les centrioles. Elle a l'avantage de s'appliquer aussi bien aux métazoaires qu'aux levures.

Dans tous ces travaux, il ne s'agit pas tant d'identifier le 'polar organizer' que de comprendre quels sont les paramètres cellulaires qui contrôlent sa duplication, car le couplage de cette duplication au cycle de division cellulaire est une condition *sine qua non* à la formation d'un fuseau bipolaire et à la réussite de la mitose. L'existence d'un mécanisme de couplage est mis en évidence (Sluder and Rieder, 1985a, Sluder et al., 1989b), et donne naissance à l'idée du 'licensing factor', une modification des centrioles, effectuée une fois par cycle de division cellulaire et qui les rend aptes à se dupliquer (encore un petit anachronisme : Hinchcliffe et al., 1998).

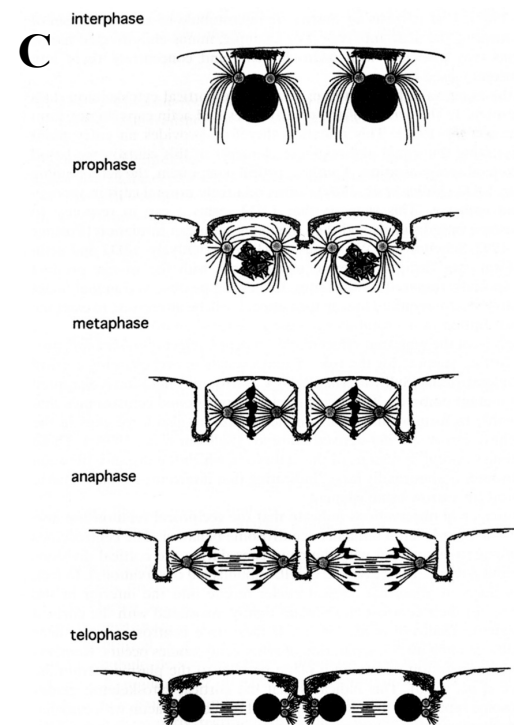
La levure *cerevisiae* est l'autre système privilégié pour l'étude des couplages entre cycle de duplication du centrosome et cycle de division cellulaire, grâce aux nombreux mutants de cycle conditionnels. Cependant, certains contrôles semblent plus étroits dans la levure que dans d'autres organismes : on ne trouve pas de mutants avec plus de deux SPB par noyau (il y a des mutants avec plusieurs SPB, mais il s'agit d'endo-réplication, c'est à dire des cycles de réplication de l'ADN sans mitose, Baum et al., 1988), alors que dans les ovocytes fécondés et dans certaines cellules somatiques, un blocage de la réplication de l'ADN n'empêche pas la duplication des centrosomes de se poursuivre (Sluder and Lewis, 1987, Raff and Glover,



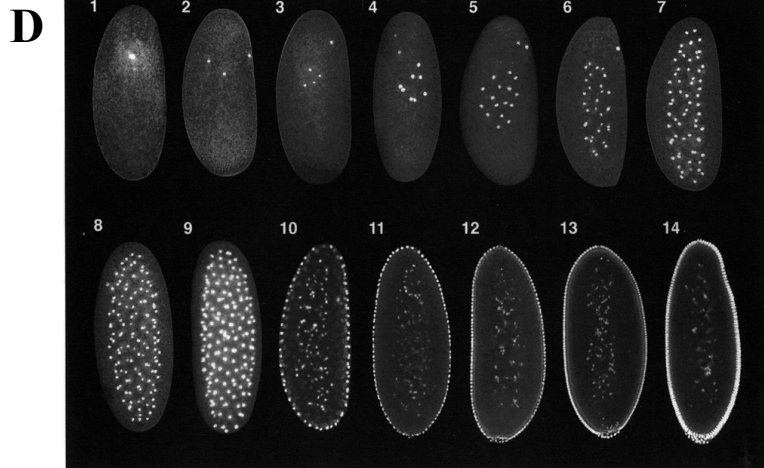
**Fig. 1.** Diagrammatic representation of postfertilization events leading to first mitosis in the sea urchin zygote.



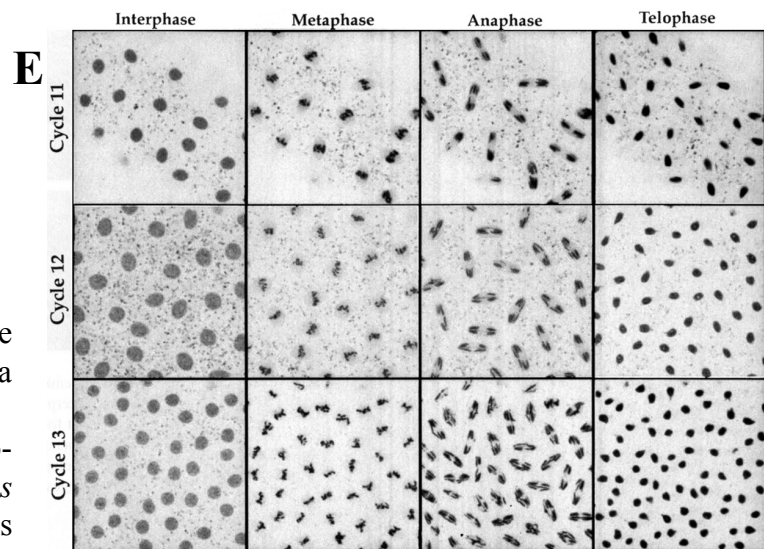
**Figure 1** Time-lapse recording of a *C. elegans* zygote.



**Figure 6** During interphase, actin caps are centered above each centrosome and its astral microtubules. As the centrosomes separate, the actin caps undergo a corresponding redistribution. The actin based furrows invaginate during late prophase and metaphase. During anaphase and telophase these furrows retract, and actin caps begin to reform around the newly duplicated centrosomes.



**Figure 1** The first 13 divisions are rapid, synchronous, and occur without accompanying cytokinesis. Cellularization occurs during interphase of nuclear cycle 14. Centrosomes play a key role in the differentiation of three types of nuclei during these divisions: the posterior pole cells, the cortical nuclei, and the internal polyloid yolk nuclei.



## Figure 18 : Le centrosome et le développement

**A** : Fécondation chez l'oursin (Sluder, dans *The Centrosome*, 1992). A comparer au même schéma par Wilson (1925).

**B** : Fécondation, pseudoclivages, fusion des pronucléi et première division du zygote de *C.elegans* en DIC (contraste interférentiel, O'Connell, dans *The Centrosome*, 2001)

**C** : Schéma des pseudo-clivages dans le syncytium de drosophile. La proximité des centrosome et du cortex définit la zone de constriction (Rothwell et Sullivan, dans *The Centrosome*, 2001)

**D** : La disposition des noyau dans le syncytium de drosophile (*ibidem*). Un défaut dans la capacité de nucléation des centrosomes (mutants *cnm* ou *asterless*) ou dans l'ancrage des centrosome aux noyaux (mutant de dynéine par exemple) entraînerait une agrégation des noyaux.

**E** : Les mitoses synchrones dans le syncytium de drosophile (Tram et al., *Centrosomes and Spindle Pole Bodies*, 2001).

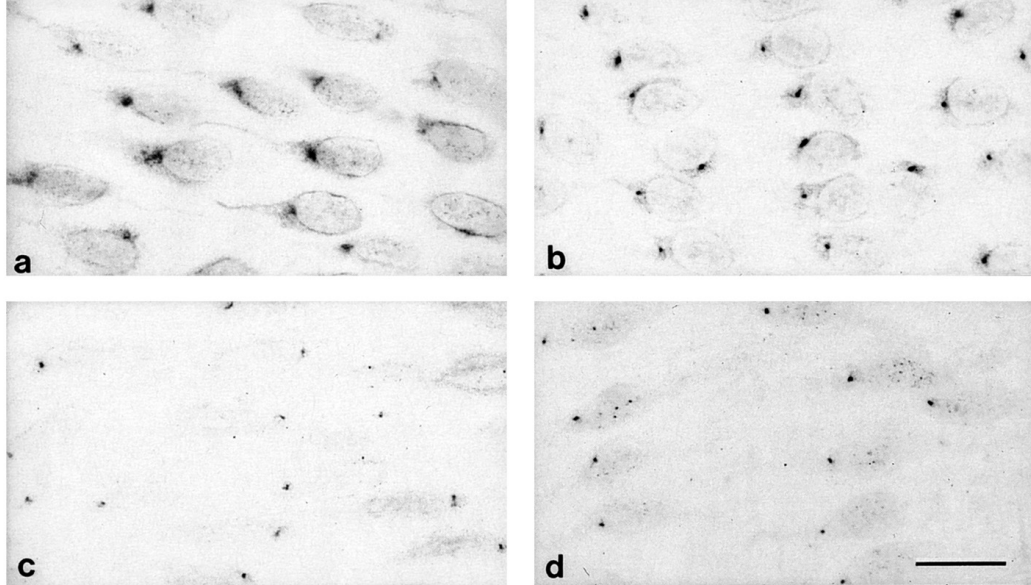
1988, Gard et al., 1990, Balczon et al., 1995). Il est aussi montré dans ces mêmes travaux que la phase S est une phase 'permissive' pour la duplication des centrosomes, ce qui n'est pas le cas pour la mitose, ou pour la phase G1 (dans les cellules somatiques, les ovocytes n'ayant souvent pas de phase G1). Certains auteurs posent aussi le problème dans l'autre sens : les centrosomes exercent-ils un contrôle sur le déroulement du cycle de division cellulaire (Brooks et al., 1980) ?

**- Le centrosome et le développement (*Drosophila melanogaster*, *Caenorabditis elegans*,  
Souris)**

Dans la plupart des organismes, le centrosome est important à toutes les étapes du développement et cela dès la fécondation.

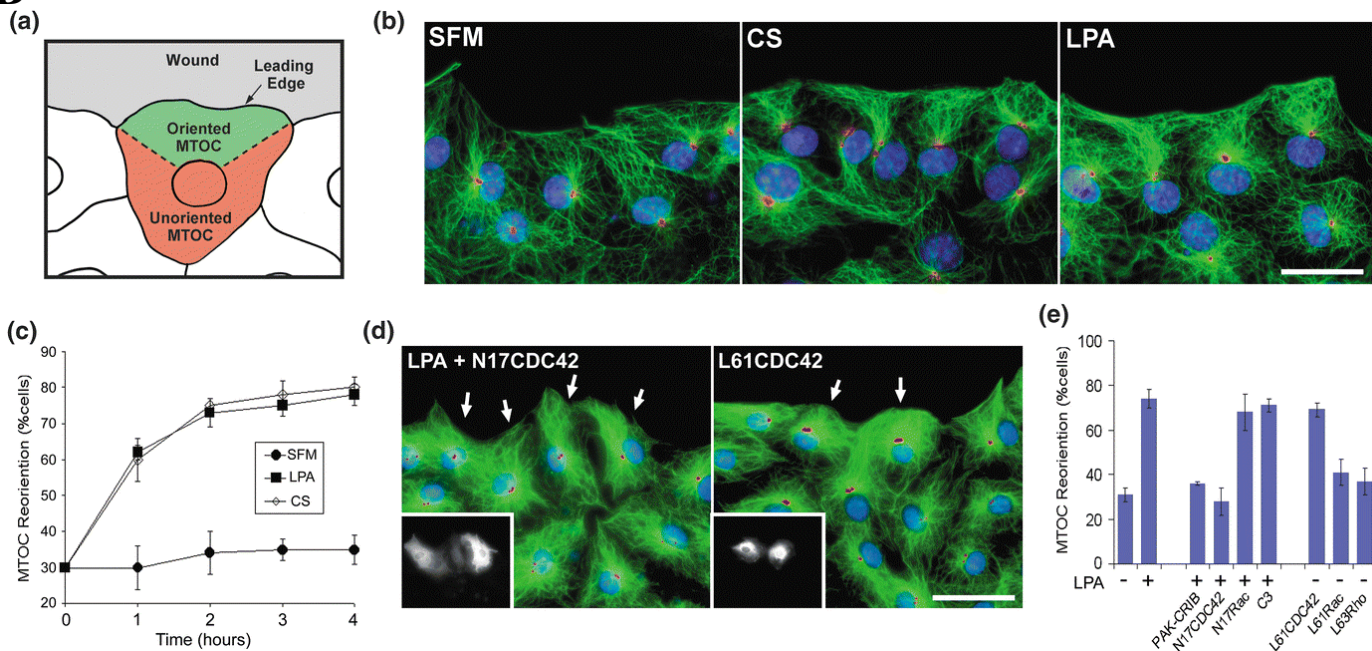
Premier problème à résoudre : les gamètes résultant des méioses successives possèdent chacun un centrosome, or lors de la fécondation, si les deux gamètes apportent un centrosome, l'œuf en possédera quatre avant la première mitose, c'est à dire deux fois trop – sauf s'il existe pour cette première mitose en particulier, un mécanisme qui réprime la duplication des centrosomes (discuté par Sluder, dans *The Centrosome*). Il y a donc en général un héritage uniparental, l'un des deux gamètes détruisant son centrosome. Il y a dans l'héritage centrosomal une diversité qui déroute : il peut être soit maternel, contrairement à ce qu'avait pu avancer Boveri, (chez les organismes naturellement parthénogénétiques, chez certains lézards ou certaines mouches, mais aussi chez la souris, Szollosi et al., 1972, ou le cochon, Szollosi and Hunter, 1973), soit paternel, comme chez les échinodermes (Sluder and Rieder, 1985b) ou les amphibiens et la plupart des mammifères. La destruction ou l'inactivation du centrosome d'un des gamètes a été étudié en détail dans le cas des ovocytes d'échinoderme (Sluder et al., 1989a). La souris présente un cas particulier en ce qu'elle supprime les





**Fig. 2.** Immunofluorescence staining of *en face* preparations of vascular endothelium of pig thoracic aorta (a) and inferior vena cava (b) and of rabbit thoracic aorta (c) and inferior vena cava (d) with sera specific for centrosomes. In endothelial cells (EC) in a, b, and d, centrosomes are preferentially located toward the heart (on the left). However, in EC in the rabbit thoracic aorta (c), no preferential orientation toward or away from the heart was detected. Blood flow is from left to right for a and c and from right to left for b and d. Bar: 18  $\mu$ m. (Reprinted from Rogers *et al.*, 1985, with permission.)

**B**



### Figure 19 : La polarité noyau/centrosome

A : L'axe noyau/centrosome des cellules endothéliales de l'aorte et de la veine cave du cochon est orienté dans le sens du flux sanguin (a, b) mais chez le lapin, ce n'est vrai que dans la veine cave (c) et pas dans l'aorte (d)...d'après Kalnins et Rogers dans *The Centrosome* (1992).

B : Des expériences récentes pour comprendre la biochimie du mouvement du centrosome lors d'expériences de 'wound healing'. Le schéma (a) définit ce qui est considéré comme une réorientation du centrosome (cela correspond à 33% des cellules s'il n'y a pas d'orientation privilégiée). Le facteur qui induit ce mouvement est le LPA (lisosphosphatidic acid). On voit les centrosomes en rouge, les microtubules en vert et le noyau en bleu. Le graphe (c) montre une activation similaire par du sérum ou par le LPA à une concentration équivalente à celle qu'il a dans le sérum. Le graphe (e) montre l'induction indépendante du LPA ou l'inhibition de son effet par les petites GTPases de la famille ras (N17, mutant inactif, N61, mutant actif). L'effet passe par CDC42 mais ni par Rho ni par Rac. Cette figure est tirée de Palazzo *et al.*, 2001.

centrosomes des deux gamètes, pour reformer des centrosomes '*de novo*' après un certain nombre de divisions.

Le développement précoce (blastula) qui se déroule sur les produits des gènes maternels, dans des cellules souvent plus grosses que les cellules somatiques est une étape pendant laquelle les questions de positionnement du fuseau et du noyau sont primordiales, fonctions assurées par l'aster de microtubules associé au centrosome et qui n'existe pas en son absence (étudié surtout chez *C.elegans* et chez la drosophile qui a un développement précoce original puisque sans clivage, la cellularisation n'intervenant qu'après la 13<sup>ième</sup> mitose, voir D. Glover dans The Centrosome). Le développement plus tardif implique beaucoup de divisions asymétriques et de contrôles d'orientation et de positionnement du plan de clivage des cellules (dans ce cas, la drosophile est le système le plus utilisé, car beaucoup d'outils d'analyse génétique existent) qui nécessitent le plus souvent la présence d'un centrosome fonctionnel. Ces rôles de positionnement des chromosomes dans la cellule mitotique ou du noyau dans la cellule interphasique et de définition du plan de clivage rappellent le fameux couplage de la division cytoplasmique et de la division nucléaire proposé par Boveri. C'est un rôle que le centrosome remplit principalement grâce aux microtubules astériens qui n'existent pas en son absence (remarqué dans tous les systèmes d'assemblage de fuseau sans centrosome cités plus haut). On lui attribue souvent dans ce contexte un rôle de simple lien entre l'ADN et le cortex cellulaire.

#### **- Le centrosome et la polarité cellulaire (lymphocytes, locomotion)**

La théorie de von Lehnossek et Hennequy (voir plus haut) est confirmée par des expériences d'injection de corps basaux dans des ovocytes et de nucléation sur des centrosomes dépourvus de matrice (ils nucléent des microtubules dans le prolongement des triplets) : il y a bien identité des centrioles et des corps basaux (Heidemann and Kirschner, 1975, Kuriyama and

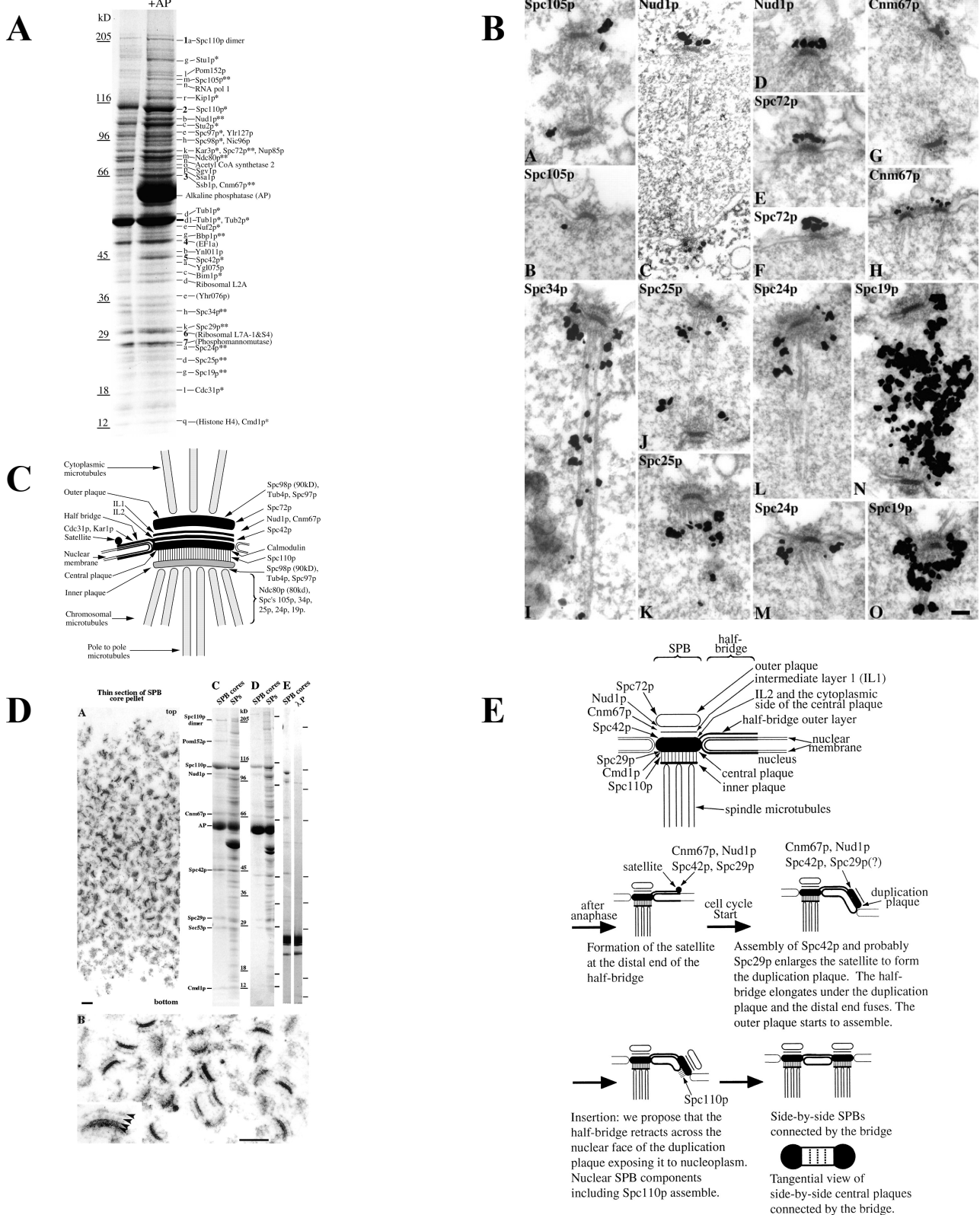
Kanatani, 1981). Plusieurs découvertes - celle de mutants dont les axonèmes ne fonctionnent pas (Luck, 1984), et auxquels il manque une structure répartie tout le long de l'axonème qui contient une ATPase appelée dynéine (Gibbons and Gibbons, 1973; Gibbons and Rowe, 1965), mais surtout la découverte de l'absence de centriole dans certains spermatoocytes matures - tendent à exclure un rôle du centriole dans la production de la force qui fait battre les cils et les flagelles. En revanche des études sur des ciliés et des flagellés (*Chlamydomonas* en particulier) suggèrent un contrôle du battement par les centrioles (voir Beisson and Jerka-Dziadosz, 1999 pour une revue).

De même, la motilité des cellules amiboïdes est attribuée à l'actine et à la myosine (Spooner et al., 1971, Small, 1989), mais la directionnalité de la migration (et en particulier la capacité chimiotactique) semble pouvoir être attribuée aux microtubules dans certains systèmes (revue de M.Schliwa dans *The Centrosome* ; Anderson et al., 1982; Bandmann et al., 1974; Keller et al., 1984; Malech et al., 1977; Rich and Hoffstein, 1981; Roberts et al., 1982). Les auteurs du début du siècle avaient proposé que le vecteur formé par les positions relatives du centrosome et du noyau définisse une polarité cellulaire qui pourrait être utilisée dans divers réponses de la cellule. Plusieurs systèmes sont utilisés dans les années 80 pour tester cette hypothèse, grâce à deux techniques qui permettent alors de faire une étude statistique de la position du centrosome : les anticorps et le 'whole mount' (technique de microscopie, Schliwa et al., 1982, Pryzwansky et al., 1983), techniques qui ont le défaut d'imposer la fixation des échantillons et qui interdisent donc une étude de la dynamique. Les systèmes utilisés sont par exemple l'activation des lymphocytes T, qui implique une polarisation du lymphocyte vers la cellule cible (voir la revue de M. Paulin-Levasseur dans *The Centrosome*, Rudd et al., 1979, Brown et al., 1985), pendant laquelle le centrosome se restructure et augmente sa capacité de nucléation des microtubules (Schweitzer and Brown, 1984) ; à la polarisation des cellules induite par la formation d'une 'blessure' dans une monocouche de cellules endothéliales

(‘wound response’ ; voir le revue de V.I. Kalnins et K.A. Rogers dans *The Centrosome*, Gotlieb et al., 1981), ou la réponse chimiotactique des polymorphonucléaires au TPA, ‘tumor promoting agent’, (Schliwa et al., 1982). Enfin, une orientation privilégiée de cette polarité centrosome/noyau est aussi observée in vivo dans les cellules endothéliales de l’aorte et il est démontré qu’elle correspond avec le sens du flux sanguin (Rogers et al., 1985). Il ressort de toute cette série d’expériences que la polarité définie par le noyau et le centrosome peut avoir un sens dans certains systèmes (les lymphocytes par exemple), mais que la direction de migration ne coïncide pas toujours avec le vecteur formé par le centrosome et le noyau (Euteneuer and Schliwa, 1992)– en particulier certains auteurs qui pensent pour d’obscures raisons que le centrosome ne peut avoir un rôle dans le contrôle de la migration qu’en étant ‘en avant’ du noyau sont perturbés de le trouver dans de nombreux cas ‘en arrière’ (par rapport à la direction de migration). Finalement, la découverte de la motilité directionnelle (selon un gradient chimique ou dans un champs électrique) de certains fragments de cellules dépourvus de centrosomes (et de noyau) met pour beaucoup un point final à l’hypothèse d’un rôle quelconque du centrosome dans la motilité des cellules amiboïdes (Euteneuer and Schliwa, 1984). Pourtant, s’il existe des mécanismes ‘par défaut’ du contrôle de la motilité (comme pour l’assemblage du fuseau mitotique), on peut très bien imaginer qu’il existe un contrôle qui vienne se surajouter à ces mécanismes. Les expériences d’ablation ne peuvent donc jamais donner une réponse définitive et il faut étudier les systèmes comportant un centrosome pour savoir si ce dernier à un rôle à jouer dans la migration cellulaire. Ainsi, une idée originale mais qui n’a malheureusement pas donné lieu à beaucoup d’expériences est celle d’un rôle du cil primaire nucléé par le centrosome parental de nombreuses cellules, qui pourrait permettre de ‘sentir’ des flux ou des gradients et d’influer sur la directionnalité de la migration (Albrecht-Buehler, 1977; Albrecht-Buehler and Bushnell, 1979).



Indépendamment du mouvement des cellules, le rôle du système centrosome/microtubules dans la polarité cellulaire en général (qui ne coïncide pas avec la notion de polarité définie par le noyau et le centrosome) est un thème récurrent. Il s'agit de savoir comment une cellule (dans un organisme le plus souvent) se polarise en réponse à des signaux extérieurs. On peut relever deux types d'idée : celle d'une auto-organisation liée aux propriétés des microtubules et qui ne nécessiterait aucune polarité pré-établie (Kirschner and Mitchison, 1986a) et celle de l'existence d'une polarité intrinsèque à la cellule qui s'orienterait en réponse à un signal extérieur (Bornens, 1991). La différence entre ces deux hypothèses est en fait assez mince (les mécanismes de bases sont des mécanismes d'auto-organisation, mais il existe des structures qui sont capable de conserver une certaine polarité à une échelle de temps plus grande, ce qui rend l'alignement plus rapide ou bien astreint la polarité à d'autres contraintes). Encore une fois, ce n'est pas parce que des mécanismes simples régissent l'organisation des microtubules (l'instabilité dynamique et la stabilisation des bouts) que des mécanismes de contrôle ne viennent pas se superposer à ces mécanismes dans le cadre de réponses cellulaires complexes. Il faut noter que tous les rôles supposés et plus ou moins avérés du centrosome dans cette période faste des années 80 sont liés à sa capacité à nucléer des microtubules. Si on lui enlève cet attribut, il ne sait plus rien faire. D'où l'idée que toutes ses fonctions sont peut-être simplement dérivées de celle-là, ce qui a contribué à renforcer le concept de MTOC et à faire oublier le centrosome, organite complexe (par exemple si l'on oublie la présence de cet organite au sein de l'aster de microtubule, on ne peut pas imaginer l'existence de mécanismes de régulation de l'ancrage ou de la nucléation en réponse à divers stimuli, mécaniques entre autres, comme pour les kinétochores).



## **7. Le centrosome moléculaire deuxième partie : le séquençage des génomes**

La fin des années 80 et le début des années 90 marquent un ralentissement des découvertes concernant le centrosome : les outils moléculaires tardent à se développer et de nombreux champs en extension rapide attirent toutes les énergies (la biochimie des microtubules et en particulier de leur nucléation, le cycle cellulaire, les moteurs moléculaires). Il faudra attendre la fin des années 90 pour que soudain l'attention se focalise à nouveau sur le centrosome. Quelles sont les raisons de ce regain d'intérêt ? Probablement le décollage de la biologie moléculaire du centrosome, d'abord dans la levure - tous les composants du SPB sont analysés grâce au couplage d'une purification et d'un séquençage protéique par MALDY TOF rendu possible par l'étendue du séquençage du génome de cet organisme, suivis d'une production d'anticorps et d'une localisation en microscopie électronique (Wigge et al., 1998) - qui s'est répercuté sur les autres organismes (Tassin et al., 1998; Tassin et al., 1997). D'une manière générale, les données de séquence de plus en plus nombreuses facilitent beaucoup les choses et le centrosome moléculaire peut enfin advenir et livrer quelques-uns de ses secrets.

Ainsi les étapes à l'établissement de la 'carte génomique' du centrosome d'un organisme sont idéalement : la purification du centrosome, la fabrication d'anticorps et l'analyse de tous les composants par séquençage protéique puis de leurs interactions par la technique du 'double hybride'. Il aura quand même fallu attendre dix ans entre les premiers espoirs d'analyse moléculaire du centrosome et la convergence de données génétiques et de moyens techniques qui ont présidé à sa renaissance (voir la figure 1). Les deux dernières années (2000-2001) sont marquées par le séquençage complet d'un nombre grandissant de génomes et la possibilité d'annuler ou de moduler l'expression de gènes dans presque tous les systèmes, des procaryotes aux mammifères (RNAi dans les cellules en culture de mammifères : Elbashir et



al., 2001). On peut donc prévoir un beau futur pour l'étude du centrosome. L'état général des connaissances actuelles sur le centrosome est présenté dans le chapitre suivant.

## **8. Résumé et conclusions**

**1890-1920 :** découverte du centrosome et premier énoncé de ses propriétés qui seront immédiatement remises en question : son universalité, son 'autonomie', son importance dans la division cellulaire. Seule la théorie de Lehnossek et Hennequy sur l'identité des centrioles et des corps basaux est épargnée.

**1920-1950 :** Le centrosome n'a de sens qu'en tant que corps basal.

**1950-1970 :** Découverte de l'ultrastructure des centrioles, de son universalité. Reprise des débats du début du siècle sur les bases des observations en microscopie électronique. Découverte des microtubules. Le centrosome devient le MTOC (l'organisateur des microtubules).

**1970-1990 :** Purification des centrosomes, production d'anticorps. Les premières questions sont revisitées sur les bases de la biologie moléculaire. Définition des systèmes modèles.

**1990-2001 :** Le centrosome moléculaire et génétique. Foisonnement d'informations mais toujours pas de fonction avérée pour le centriole, à part celle –mal définie- de l'assemblage des cils et des flagelles. La complexité de cet organite laisse perplexe.

### **Les écueils qui se dessinent sont donc :**

- 1) Continuer implicitement à utiliser les concepts cytologiques du début du siècle (comme les questions d'assemblage '*de novo*' ou 'd'autonomie' du centrosome) à l'heure de la biologie moléculaire, ce qui se traduit par une confusion permanente

entre le centrosome comme organite et comme complexe moléculaire (on arrive à des questions du type : telle protéine interagit-elle directement avec le centrosome ou par l'intermédiaire d'une autre protéine ?).

- 2) Définir le centrosome par rapport aux microtubules (le MTOC) et du même coup ignorer la complexité de l'organite qui devient alors un relais passif entre les microtubules et le noyau.
- 3) Se restreindre à quelques systèmes modèles de moins en moins nombreux, qui disposent d'une base expérimentale bien établie et bien adaptée à l'étude du centrosome, mais qui ne permettent pas forcément de poser toutes les questions pertinentes du fait de leurs particularités (dues à l'espèce utilisée ou aux conditions expérimentales). Ce danger est très général mais plus grand dans le cas du centrosome à cause des nombreuses difficultés techniques spécifiques à cet organite (un par cellule, petit, hétérogène).

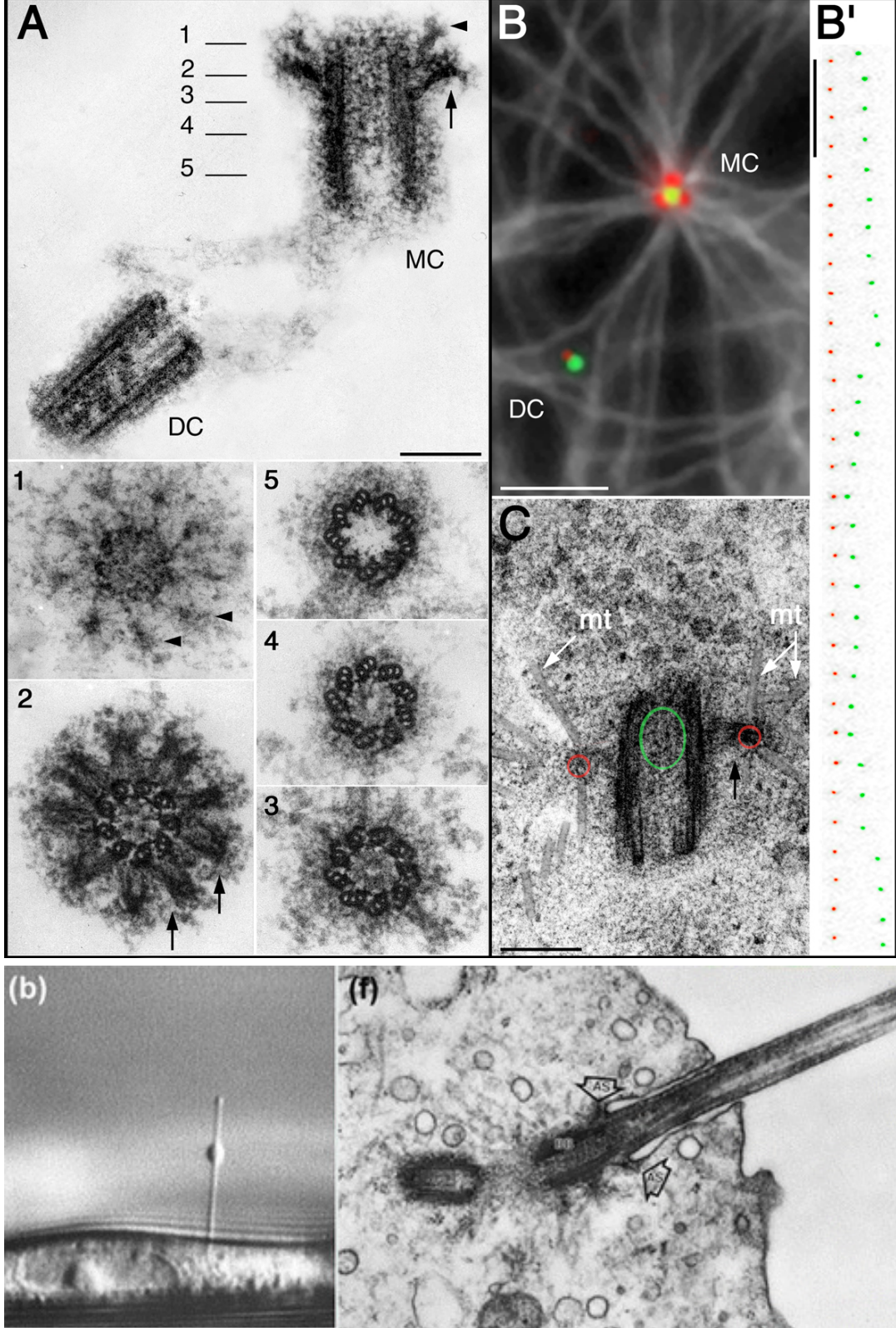


### **III. PRESENTATION GENERALE DU CENTROSOME DES VERTEBRES**

La plupart des attributs du centrosome, définis dans les années 80 ont été présentés dans la partie précédente. Il y aura cependant des redites, mais elles sont justifiées par une perspective différente. Chaque partie sera l'occasion de définir le centrosome des vertébrés sous un angle particulier : ultra-structure, reproduction et assemblage, composition moléculaire, fonction. Avec l'espoir d'en donner une définition suffisamment précise sans pour autant le figer dans une pose trompeuse. Il faut préciser qu'un certain nombre de travaux auxquels il est fait référence ne sont pas des travaux réalisés chez des organismes vertébrés. Quand il s'agit d'autres deutérostomiens (principalement des échinodermes ou des batraciens), il n'y a en général pas de différence notable avec les vertébrés – pour ce qui est du centrosome. En revanche, les organismes protostomiens peuvent avoir des centrioles différents et ont un développement très particulier (par exemple les cuticulates dont un grand nombre n'ont plus de cils). Les références à ces organismes seront indiquées clairement.

#### **1. Structure et dimensions**

Des structures régulières observées par les premiers utilisateurs de microscopie électronique dans les années cinquante ont pu être assimilées aux corpuscules centrosomiens décrits dans la première partie du siècle: les centrioles (figure 21). Les cellules de vertébré, comme celles de la plupart des métazoaires contiennent un unique centrosome – on parle ici du centrosome défini de la manière la plus simple : un corpuscule situé au centre d'un aster de microtubules,



**Figure 21: Ultrastructure du centriole**

A : Centrioles isolés de cellules lymphoblastiques humaines (Paintrand et al., 1992). Au bout distal (coupes 1 et 2) on voit les appendices distaux (1) et sub-distaux (2) du centriole parental (MC). Les deux centrioles sont reliés par une matrice associée à leur bout proximal et à leur paroi. B et C : Dans la cellule, des microtubules (mt) s'associent aux bras sub-distaux du centriole parental (en rouge, la protéine ninéine et en vert la protéine centrine, voir le papier 1 pour le B', mouvement des centrioles). Images du bas : le centriole parental peut aussi être associé à un cil primaire, vu en DIC (b) et en microscopie électronique (f) (tiré de Khodjakov et al. 2001).

à proximité du noyau en interphase, qui se duplique au cours du cycle cellulaire et qu'on trouve aux pôles du fuseau en mitose. Cela suffit à l'identifier dans la plupart des cellules. Il est constitué de deux structures centriolaires entourées d'un matériel dense aux électrons appelé matrice péricentriolaire (voir la figure 22).

### **- Le centriole**

La structure des centrioles est très conservée, non seulement au sein des vertébrés mais d'une manière générale chez tous les eucaryotes qui en possèdent. Une description précise est donc tout à fait valable. La description qui suit est fondée sur l'étude de centrioles isolés de lymphoblastes humains (Paintrand et al., 1992, à partir duquel sont tirées les images de la figure 21), quelques variantes seront décrites.

Le centriole a une structure cylindrique d'un diamètre d'à peu près 250 nm (le diamètre est très conservé) et d'une longueur de 400 nm pour la plupart des cellules somatique (la longueur est assez constante chez les vertébrés, mais peut, dans certaines espèces varier considérablement, de 150 nm dans les cellules somatiques de drosophile à 700 nm dans son spermatozoïde, voire jusqu'à 8 µm chez certains unicellulaires ciliés). On distingue un bout distal et un bout proximal, d'après l'orientation que prennent les centrioles quand ils servent de corps basaux pour des axonèmes (le bout distal est celui qui est prolongé par l'axonème, donc dirigé vers l'extérieur de la cellule). Le cylindre est composé de neuf triplets de microtubules dans sa partie proximale, où se situent les bouts moins des microtubules, ce qui le différencie des axonèmes qui comportent des doublets. Néanmoins, le microtubule dit C peut disparaître avant le bout distal qui est alors composé de doublets comme l'axonème (ce n'est pas le cas pour toutes les espèces), ce qui a amené certains auteurs à proposer que le centriole comporte deux domaines fonctionnels : le domaine distal servant à organiser les microtubules (asters ou axonème) et le proximal à la reproduction des centrioles (on verra



plus loin que c'est sur cette partie que s'accroche les centrioles en cours d'assemblage ou pro-centrioles). Seul le microtubule A est complet, les deux autres sont des arcs qui se ferment sur le microtubule adjacent. Les triplets sont reliés par des fibres externes (dynéine ? kinésine ?). Le plus souvent, le bout proximal est transparent aux électrons alors que le bout distal est rempli d'une matrice dense qui semble être structurée autour d'un anulus (mais certains centrioles sont entièrement 'vides').

Autour de ce cylindre de microtubules peuvent s'organiser d'autres structures régulières qui vont le différencier. Ainsi, les deux centrioles d'une cellule sont souvent armés différemment : l'un des centrioles, appelé centriole parental (voir la reproduction plus loin), porte deux séries d'appendices qui respectent la symétrie 9 du centriole. Les plus distaux semblent pouvoir interagir avec la membrane plasmique lors de la ciliogenèse (voir la figure 21) ; alors que les appendices subdistaux sont utilisés pour ancrer des microtubules (voir la figure 21 et plus bas). Quand le centriole est un corps basal, il est aussi muni de fibres striées contractiles ancrées sur son extrémité proximale et qui semblent servir à le maintenir et peut-être à l'orienter afin de modifier le battement de l'axonème (ce n'est pas connu chez les vertébrés, mais suggéré par analogie à certaines algues flagellées, McFadden et al., 1987). Ces fibres sont aussi observées dans des cellules de type fibroblastiques ou épithéliales, mais qui peuvent dans certaines conditions fabriquer un cil primaire (figure 21 ; les cellules Ptk ou 3T3, Albrecht-Buehler and Bushnell, 1980). Le rôle de ces cils primaires commence tout juste à être suspecté dans quelques cas particuliers au cours du développement (Nonaka et al., 1998). Le rôle des fibres contractiles est en revanche inconnu, mais on peut imaginer qu'elles servent à modifier le battement du cil ou bien à transduire les déplacements du cil en signaux chimiques (elles seraient alors des mécanosenseurs).



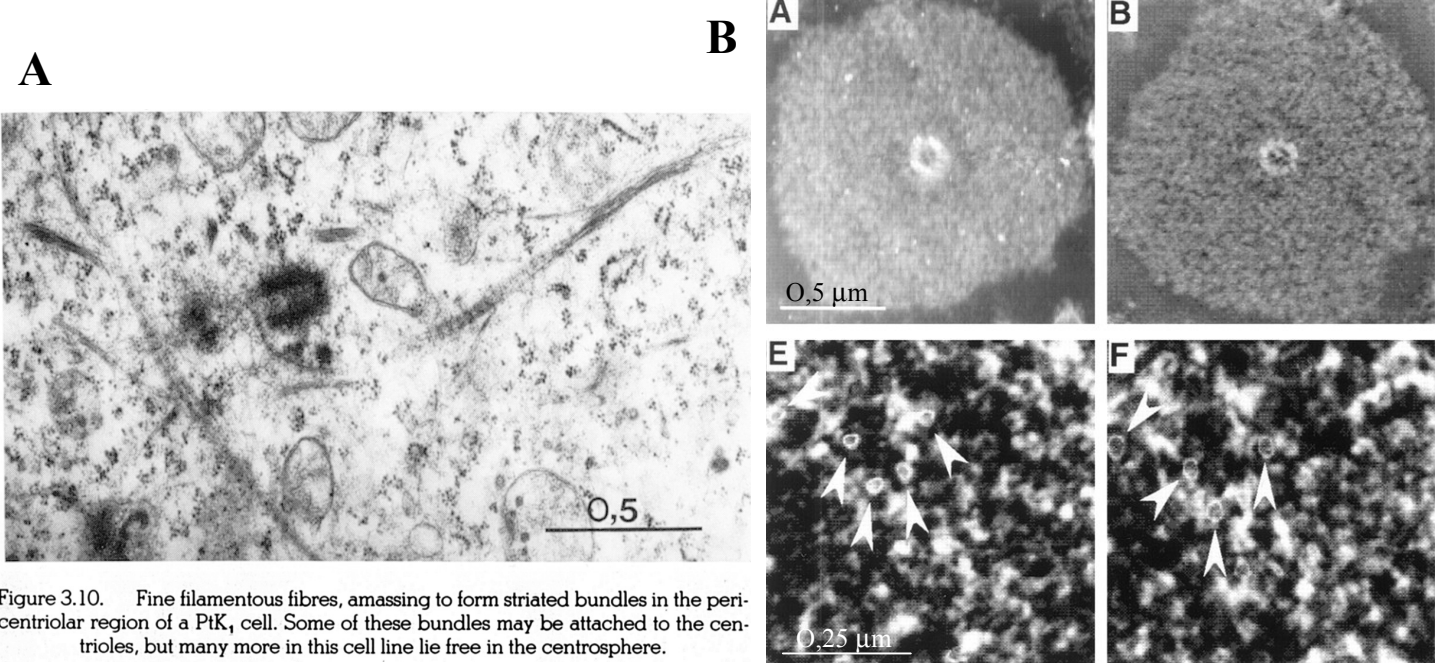
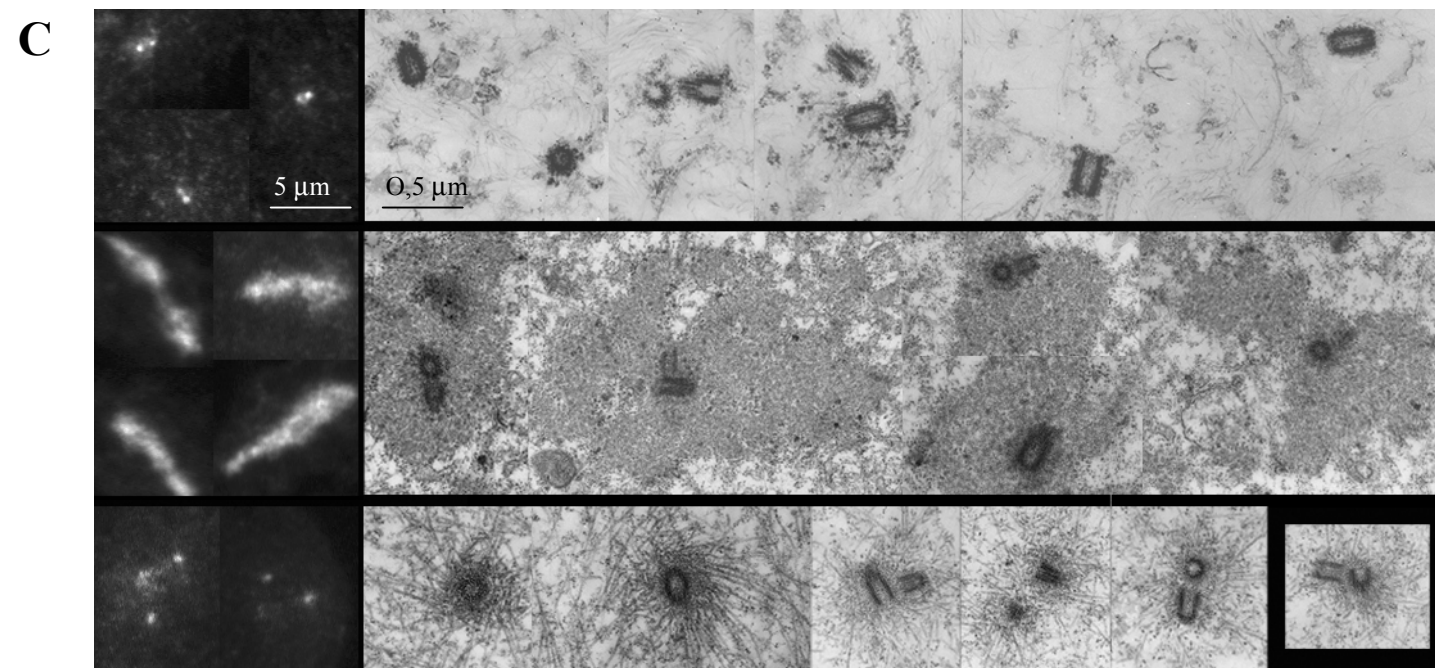


Figure 3.10. Fine filamentous fibres, amassing to form striated bundles in the pericentriolar region of a PtK<sub>1</sub> cell. Some of these bundles may be attached to the centrioles, but many more in this cell line lie free in the centrosphere.



### Figure 22 : La matrice péricentriolaire : quelques exemples

A : Dans des cellules somatiques en interphase (ici des PtK<sub>1</sub>), la matrice n'est pas très abondante. Ces cellules possèdent en plus des fibres striées qui ressemblent aux fibres contractiles habituellement associées aux corps basaux. Les PtK<sub>1</sub> ont souvent des cils primaire, ce qui pourrait expliquer la présence de ces fibres (tiré de Wheatley, The Centriole, 1982).

B : La matrice d'un centrosome isolé d'un ovocyte de *Spisula solidissima*. Elle est très abondante (le centriole est le petit cercle blanc au milieu de la grande masse). Elle contient des anneaux qui pourraient être des anneaux de  $\gamma$ -tubuline servant à nucléer les microtubules (Vogel et al., 1997).

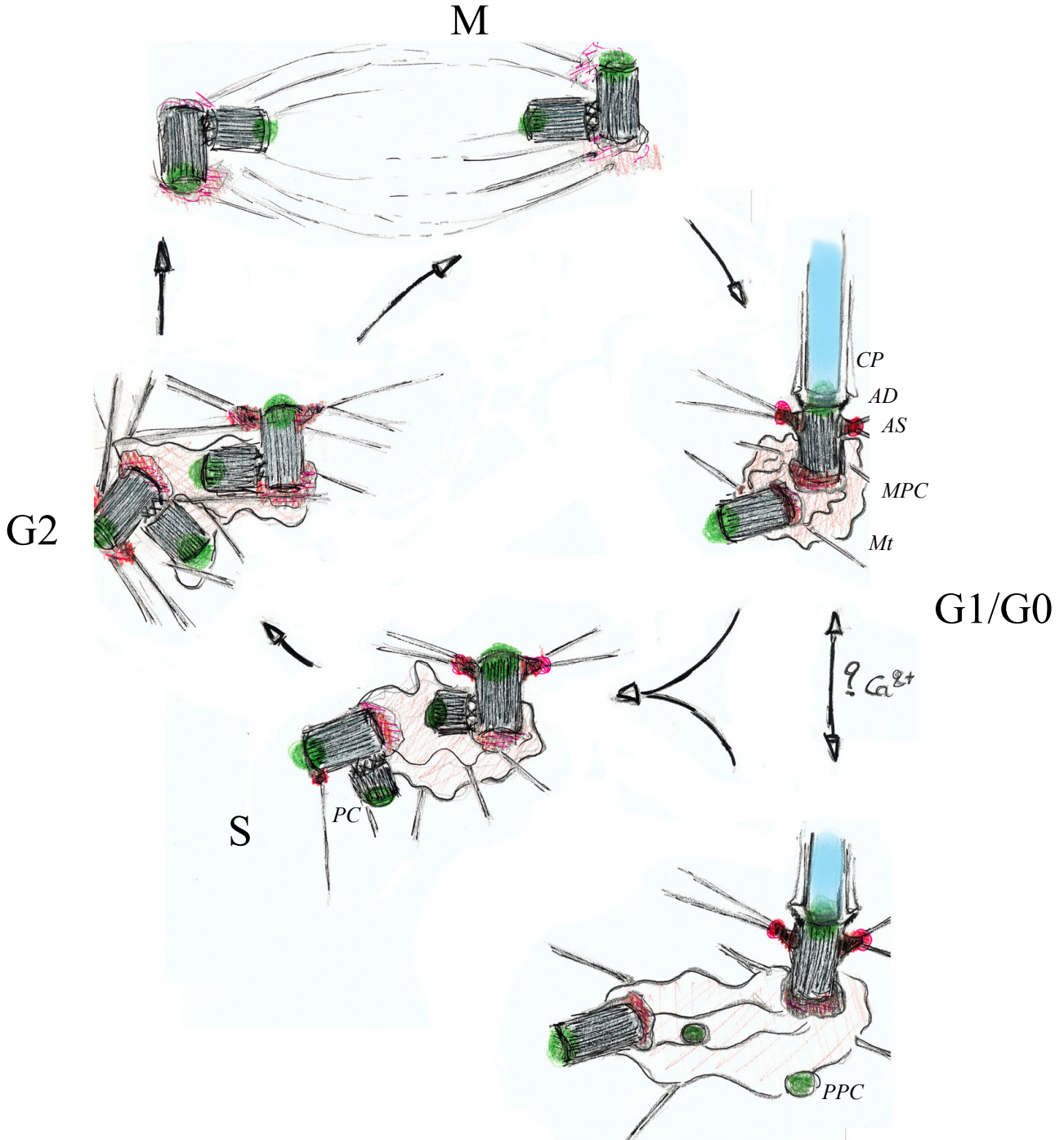
C : Des centrosomes isolés de cellules de souris en début de G1 (première ligne) sont incubés dans un extrait d'ovocyte de xénope (voir papier 4). Au bout d'une heure en interphase, ils se sont dupliqués et ont amassé de la matrice (deuxième ligne). Si l'extrait passe alors en mitose, la matrice régresse presque au niveau de celle des cellules de départ, mais les microtubules nucléés sont très abondants (ligne 3). A gauche on voit la matrice en immunofluorescence grâce à un anticorps dirigé contre la  $\gamma$ -tubuline. (Piel et al., résultats non publiés, images de M. Paintrand).

### **- La matrice péricentriolaire**

La matrice péricentriolaire a été décrite comme un matériel amorphe contenant des fibres d'environ 10 nm (Schnackenberg et al., 1998) et parfois des anneaux qui sont assimilés à des complexes de nucléation des microtubules (Moritz et al., 1995a; Moritz et al., 1995b, Vogel et al., 1997). Elle semble pouvoir se contracter en réaction à la présence de calcium, ce qui en ferait un analogue moins organisé des fibres que l'on trouve chez les unicellulaires ciliés ou flagellé. Cela n'a pu être jusqu'à présent observé que *in vitro*, à partir de l'aspect de la matrice accompagnant des centrioles isolés en présence de calcium ou d'EGTA (Paintrand et al., 1992).

L'extension de la matrice peut varier considérablement d'un type cellulaire à l'autre et au cours du cycle de division cellulaire (de 0,5  $\mu\text{m}$  dans le centrosome interphasique de mammifère à quelques  $\mu\text{m}$  dans certains embryons). Elle contient aussi fréquemment des granules - sur lesquels on peut trouver ancrés des microtubules, des filaments intermédiaires ou des microfilaments - et parfois des particules virales (revue dans J.B. Rattner, The Centrosome et dans D.N. Wheatley, The Centriole). Tous ces 'satellites' ne doivent pas être confondus avec les appendices distaux et sub-distaux (aussi appelés 'basal foot' quand il s'agit de corps basaux) qui sont clairement ancrés par des fibres sur les microtubules centriolaires (Paintrand et al., 1992).

Enfin, cette matrice péricentriolaire semble constituer un lien entre les deux centrioles. La preuve la plus directe de sa fonction de lien provient des expériences d'isolement des centrosomes : une fois purifiés, ils contiennent presque toujours deux centrioles qui sont reliés par du matériel péricentriolaire ancré à leurs extrémités proximales. La longueur et la densité des fibres qui les relient varient selon la concentration de calcium présente lors de l'isolement, suggérant la possibilité d'une régulation de la longueur de ce lien *in vivo*.



**Figure 23 : Cycle de duplication des centrioles**

Les deux centrioles d'une cellule en G1/G0 ne sont habituellement pas équivalents : L'un porte des appendices distaux (*AD*) qui sont éventuellement associés à une invagination de la membrane plasmique si le centriole porte un cil primaire (*CP*), et des appendices sub-distaux (*AS*) associés à des faisceaux de microtubules (*Mt*). Dans cette phase, les deux centrioles peuvent se situer à des distances variables l'un de l'autre. Le facteur qui contrôle de cette distance est inconnu (l'ion calcium est un candidat, suite à des expériences sur centrioles isolés). L'autre centriole a été assemblé à proximité du premier au cycle précédent et est dit immature ou centriole fils. Les deux centrioles sont reliés par une matrice péricentriolaire (*MPC*) ancrée à leur extrémité proximale. Des expériences préliminaires et des analogies avec certains flagellées suggèrent qu'il pourrait déjà exister en G1 des complexes contenant des protéines des centrioles associés à chaque centriole (pré-procentrioles, *PPC*). A la transition G1/S apparaissent des centrioles courts ou pro-centrioles (*PC*) associés aux extrémités proximales de chaque centriole. En G2 les pro-centrioles ont atteint la taille d'un centriole et les appendices sub-distaux du centriole père commencent à disparaître. Le centriole fils est associé à de plus nombreux microtubules. A la transition G2/M les deux paires de centrioles se séparent et se placent aux pôles du fuseau. Les centrioles parentaux sont souvent perpendiculaires à l'axe du fuseau. A la fin de la mitose, les deux centrioles de chaque paire perdent leur orthogonalité et les centrioles parentaux sont à nouveau associés à des appendices sub-distaux (vert : centrine, rouge : ninéine)

## **- Conclusion**

Le centrosome des vertébrés constitue un ensemble dont la cohésion permet l'isolement, et le corpuscule isolé conserve une capacité de nucléation des microtubules (Mitchison and Kirschner, 1984b) et surtout une capacité à déclencher le développement parthénogénétique de l'ovocyte de xénope (Picard et al., 1987). Ce corpuscule comprend deux centrioles insérés dans une matrice fibrillaire à extension variable. Il est petit à l'échelle de la cellule, mais suffisamment grand pour avoir une structure complexe définissant un grand nombre de sous-domaines. Les centrioles sont bien définis, mais la matrice qui les entoure l'est moins. De ce fait, chez les vertébrés, on reconnaît le centrosome aux centrioles et, même quand cela est implicite, on appelle centrosome tout organite qui contient des centrioles. Cela permet d'étendre la définition du centrosome à des types cellulaires qui n'ont pas forcément d'aster de microtubules (les neurones, certaines cellules épithéliales).

## **2. Reproduction**

### **- Description de la reproduction semi-conservative du centrosome**

Quand une cellule entreprend de se diviser, elle duplique non seulement son ADN mais aussi ses composants cytoplasmiques, dont le centrosome. Mis à part quelques circonstances exceptionnelles qui seront discutées plus loin, la cellule de vertébré ne contient qu'un seul centrosome qu'elle va dupliquer sur un mode à peu près universel au sein des eucaryotes à centrosomes centriolaires : à proximité de chacun des deux centrioles du centrosome est assemblé un nouveau centriole qui lui est étroitement associé. Lors de la formation du fuseau mitotique les deux paires de centrioles ainsi formées migrent chacune à un pôle, si bien que les centrosomes dont hériteront les cellules issues de cette mitose comporteront chacune un

ancien et un nouveau centriole, d'où le caractère 'semi-conservatif' de la reproduction du centrosome (voir les dessins de la figure 23).

L'assemblage du nouveau centriole se fait de telle manière que l'axe de ce centriole est perpendiculaire à celui de l'ancien centriole. Il n'y a pas le moindre début de compréhension du mécanisme à l'origine de cette orthogonalité ni de sa fonction - il n'y a pas de mutant qui dupliquerait son centrosome de manière non orthogonale. La seule idée valable, mais qui n'a reçu jusqu'à aujourd'hui aucun soutien expérimental, est celle d'un rôle dans le positionnement du fuseau en mitose. Une orientation préférentielle du centriole parental perpendiculairement à l'axe du fuseau a été observée dans certains systèmes (Vorobjev and Chentsov, 1982), or deux paires de cylindres orthogonaux permettent de définir les trois axes de l'espace (pour peu que les deux centrioles perpendiculaires au fuseau ne soient pas parallèles entre eux). On imagine bien la difficulté qu'il y a à tester une telle hypothèse (il faudrait par exemple un mutant dont les deux centrioles restent ancrés au pôle mais ne sont plus orthogonaux l'un par rapport à l'autre). De plus, les brisures de symétries potentiellement engendrées par ces orthogonalités peuvent jouer un rôle sans pour autant que cela se traduise par une organisation microtubulaire dont la symétrie soit évidente (il se peut que l'organisation des microtubules astériens soit statistiquement biaisée par l'orthogonalité des deux centrioles sans que cela apparaisse clairement sur aucune image à un instant donné). Cette orthogonalité est un des mystères les mieux gardés du centrosome. Elle est d'autant plus mystérieuse qu'elle concerne, une fois encore, tous les organismes à centrosome centriolaire.

On peut distinguer un certain nombre d'étapes (quatre en général) dans le processus de duplication du centrosome (voir la figure 23). Elles ont été décrites de manière assez définitive par microscopie électronique il y a 20 ans (Kuriyama and Borisy, 1981a et Vandre et al., 1986 pour une revue), et on ne connaît pourtant à l'heure actuelle aucun mécanisme avéré. Il semble que ces étapes soient les mêmes quel que soit le type cellulaire observé. Elles

sont étroitement liées au cycle de division cellulaire selon un schéma qui dépasse le cadre des vertébrés (voir partie phylogénie).

Si l'on prend pour point de départ le centrosome d'une cellule en phase G<sub>0</sub> (la plupart des cellules d'un organisme adulte de vertébré) ou G<sub>1</sub>, il comporte deux centrioles de longueur comparable mais que l'on peut néanmoins distinguer d'un point de vue structural, l'un des deux étant muni de deux couronnes d'appendices dont les fonctions potentielles ont été mentionnées plus haut. Le premier signe de duplication visible en microscopie électronique est l'apparition d'un procentriole (un centriole court) à proximité et à angle droit de chaque centriole. La présence fréquente de granules denses dans la région péricentriolaire empêche de distinguer une étape plus précoce d'association d'un complexe sans microtubules. Puis les procentrioles s'allongent. L'étape suivante est la séparation des deux paires de centrioles ainsi formées, qui vont se placer de part et d'autre du noyau puis aux pôles du fuseau mitotique. A ce stade, le centriole parental a perdu ses couronnes d'appendices (une couronne floue perdue) et les paires des deux pôles sont équivalentes au niveau ultrastructural. Le centriole le plus ancien de chaque paire peut être reconnu puisque sa paroi est accolée au bout du centriole le plus récent. La dernière étape est la désorientation des deux centrioles qui perdent leur orthogonalité. C'est aussi à ce moment que les centrioles parentaux acquièrent leurs appendices caractéristiques. Certains auteurs font suivre cette étape d'une étape de séparation des centrioles (Hinchcliffe and Sluder, 2001). En fait, une fois les centrioles désorientés, il y a une grande variabilité des distances les séparant, selon les types cellulaires et les conditions de culture (Sherline and Mascardo, 1982a; Sherline and Mascardo, 1982b, Schliwa et al., 1982). Cette distinction entre désorientation et séparation des centrioles est l'occasion d'une confusion fréquente : en effet, les centrioles se séparent de manière permanente et marquée en S ou G<sub>2</sub>, mais ils perdent leur orientation orthogonale très tôt en G<sub>1</sub>, ce qui a été observé dès les premières études sur cellules synchronisées (Kuriyama and Borisy, 1981a; Vorobjev and

Chentsov Yu, 1982). Or un certain nombre de revues parlent de désorientation tardive en G1/S, en citant ces deux papiers ! Nous considérerons donc qu'il n'y a là qu'une étape, la désorientation des deux centrioles, qui est suivie de déplacements plus ou moins importants des centrioles l'un par rapport à l'autre. Notons que cela soulève une question délicate : quelle est la nature du lien entre les deux centrioles ?

La duplication des centrioles est conservative, mais celle du centrosome est semi-conservative, puisque chaque nouveau centrosome contient un ancien et un nouveau centriole. Cela fut démontré directement par injection de tubuline marquée dans des cellules en phase G1. Dans les cellules injectées, après duplication des centrosomes (en phase G2), la tubuline marquée ne s'est incorporée que dans un seul des deux centrioles de chaque paire (Kochanski and Borisy, 1990). Il y a évidemment un grand nombre d'hypothèses quant à la fonction de ce mode de reproduction semi-conservatif et quand aux mécanismes qui le gouvernent ; certaines sont détaillées dans les chapitres suivants. On peut dès à présent en tirer une conséquence : il serait théoriquement possible d'établir un rapport de génération entre tous les centrioles d'un organisme, puisque l'ovocyte hérite d'un centrosome unique. Chez certains unicellulaires qui ont de nombreux centrioles, on peut distinguer ultrastructuralement tous les centrioles et les ordonner suivant leur 'âge' (Mignot, 1996b), souvent grâce à la répétition d'une structure que l'on trouve chez les vertébrés uniquement transitoirement au bout proximal du centriole nouvellement assemblé, le 'cartwheel' (Anderson and Brenner, 1971). Mais aucune marque de génération au-delà de deux (le jeune et l'ancien ou le père et le fils) n'est connue chez les vertébrés. Il existe quelques protéines spécifiquement associées au centriole parental : la ninéine, qui semble être avant tout une protéine des bouts moins des microtubules et est associée aux appendices subdistaux (Mogensen et al., 2000), l'épsilon-tubuline (Chang and Stearns, 2000) et la cenexin/ODF2 (Lange et al., 2000) aux fonctions encore inconnues. La polyglutamylolation de la tubuline centriolaire (voir la partie composition moléculaire) pourrait

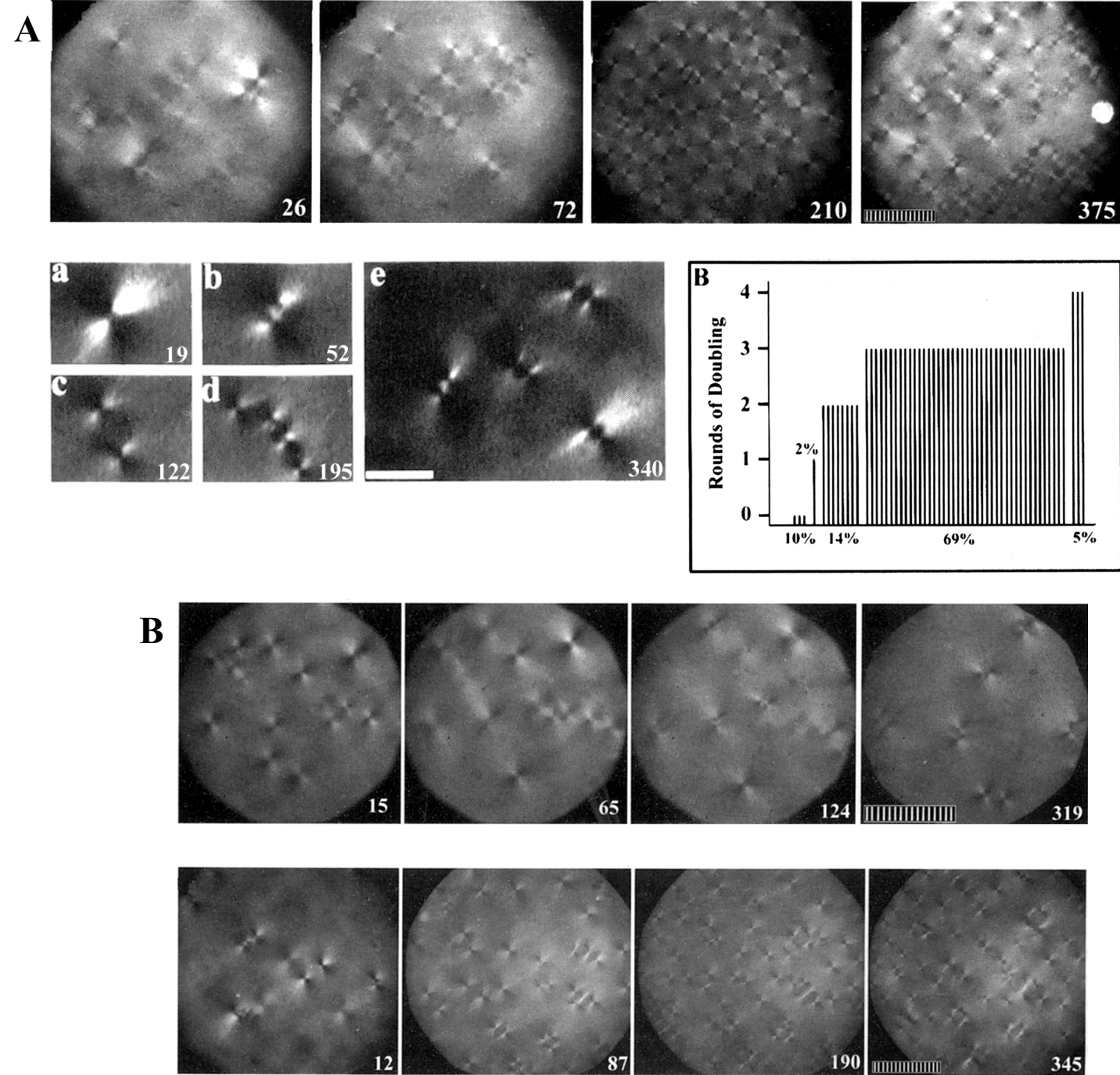
constituer un marqueur moléculaire plus fin de l'âge des centrioles, mais cela n'a pas été étudié jusqu'à présent.

A l'entrée en mitose, la cellule contient trois types de centrioles : les deux nouveaux centrioles chacun associés à l'un des anciens centrioles, qui ont eux-même une génération d'écart et qui différencient les deux paires de centrioles. Les deux pôles du fuseau ne seront donc pas équivalents. Une asymétrie entre les deux pôles est utilisée au cours du développement de nombreux organismes (Bisgrove and Kropf, 1998; Bonaccorsi et al., 2000; Chia et al., 1997; Holy and Schatten, 1991; Kaltschmidt et al., 2000; Lu et al., 1999; Luetjens and Dorresteijn, 1998; Shimizu et al., 1998; White and Strome, 1996), mais il n'a pas été démontré qu'elle était générée par les centrioles. Dans le cas des neuroblastes, chez la drosophile, si la rotation du fuseau semble nécessiter la présence de microtubules astraux, l'asymétrie est plutôt liée au fuseau (Giansanti et al., 2001).

#### **- Couplage au cycle de division cellulaire (dans les ovocytes et dans les cellules somatiques)**

Depuis les travaux de Boveri sur la polyspermie, il est admis qu'il est important pour une cellule de posséder un nombre précis de centrosomes : dans les cellules qui entrent en mitose avec un nombre anormal de centrosomes s'assemblent le plus souvent des fuseaux anormaux (monopolaires quand il n'y a qu'un centrosome et multipolaires quand il y en a plus de deux, il faut cependant noter que cette règle souffre de nombreuses exceptions, voir pour une revue Hinchcliffe and Sluder, 2001). Ces anomalies peuvent générer une aneuploïdie des cellules filles. C'est ce qui motive aujourd'hui le très grand nombre de publications qui tentent de faire un lien entre cancérogenèse et dérégulation du cycle de duplication du centrosome (pour une revue, voir Lingle and Salisbury, 2000).





**Figure 24 : L'activité de la kinase Cycline E/cdk2 est nécessaire à la duplication des centrosomes**

Ces images sont tirées de revues (Sluder et Hinchcliffe, *The Centrosome*, 1999 et Sluder et Hinchcliffe, *The Centrosome*, 2001) qui rappellent les expériences de Hinchcliffe et al. (1999).

A: Test in vitro de duplication des centrosomes de têtes de spermatozoïdes de xénope dans un extrait d'ovocyte bloqué en interphase par un traitement à l'aphidicoline. Chaque croix représente un aster. Le diagramme montre l'augmentation du nombre d'asters avec le temps. Le fait qu'il y ait plus de deux doublings exclu l'hypothèse d'une simple séparation des deux centrioles, et la progression géométrique exclu la possibilité d'une fragmentation du PCM.

B: Première ligne, l'activité de cdk2-E est bloquée par addition d'un mutant de l'homologue de p27 chez le xénope (une forme tronquée qui inhibe spécifiquement cdk2-E et pas cdk2-A), il n'y a alors qu'un seul doublement (probablement une séparation des deux centrioles des têtes de spermatozoïde). Dans la ligne du bas, le complexe cdk2-E actif est ajouté à l'extrait bloqué, et la duplication a lieu comme dans l'extrait contrôle.

En effet, les étapes de la duplication décrites plus haut se produisent en synchronie très stricte avec des étapes du cycle de division cellulaire : l'apparition des pro-centrioles a lieu à la transition G1/S, en même temps que le démarrage de la réplication de l'ADN. Leur élongation a lieu au cours de la phase S, puis la séparation des deux paires en G2/M. Enfin, la désorientation se produit en télophase (Kuriyama and Borisy, 1981a; Vorobjev and Chentsov Yu, 1982). Les principales techniques utilisées pour arriver à ces conclusions ont été des techniques de synchronisation du cycle de division des cellules couplées à des études de microscopie électronique.

Cette synchronie observée suggère l'existence de mécanismes de couplage et de contrôle élaborés. Il y a deux types d'évènements : des événements de synthèse (des nouveaux centrioles) et des événements de séparation (des deux paires de centrioles en début de mitose puis des centrioles de chaque paire en fin de mitose).

Tout d'abord les questions de séparation : ces questions impliquent que l'on s'interroge sur le lien qui relie les deux centrioles et sur la permanence de ce lien. Trois types de protéines semblent importantes pour la séparation en G2/M : des protéines situées au bout proximal des centrioles et assurant leur cohésion, des moteurs moléculaires et des kinases pour la régulation de ces protéines centrosomiales en fonction du cycle de division. La kinase Nek2 (de type NIMA) et son substrat CNAP1/CEP210 qui est concentré au bout proximal des centrioles, semble réguler la cohésion entre les centrioles parentaux, l'activité de Nek2 étant régulée en fonction du cycle cellulaire (Mayor et al., 2000). Une fois le lien détendu ou rompu consécutivement à l'inactivation de Nek2, les deux paires de centrioles sont séparées par l'action de moteurs moléculaires de type kinésine associés aux centrosomes (Waters et al., 1993) dont l'activation dépend de la kinase mitotique (comme la kinésine Eg5, Blangy et al., 1995 ; Mountain et al., 1999 ; Kapoor et al., 2000; ou la kinésine Xklp2, Boleti et al., 1996). La séparation des centrioles en fin de mitose reste plus mystérieuse. Il semble qu'elle soit

gouvernée par un évènement protéolytique particulier (Freed et al., 1999; Gstaiger et al., 1999; Lacey et al., 1999, Nakayama et al., 2000).

La question la plus cruciale reste celle de la duplication du centrosome une fois et une seule par cycle de division cellulaire (pour une revue voir Hinchcliffe and Sluder, 2001). En effet, il semble qu'une cellule qui arrive en G2 avec un nombre anormal de centrosomes ne soit pas capable d'y remédier (Sluder et al., 1997). Les contrôles sont de deux types : d'abord, un contrôle lié au centriole lui-même. Dans la plupart des cas, il faut qu'un centriole soit présent dans une cellule pour qu'elle puisse en assembler un nouveau (Sluder et al., 1989b ; Maniotis and Schliwa, 1991 ; Hinchcliffe et al., 2001 ; Khodjakov and Rieder, 2001), et le nombre de centrioles fabriqués en un cycle correspond toujours au nombre de centrioles présents (Hinchcliffe et al., 1998; Sluder and Begg, 1985; Sluder and Rieder, 1985a). Ces conclusions découlent des expériences réalisées par Mazia (Mazia et al., 1960) dans les embryons d'oursin et de celles qu'elles inspirèrent ensuite (voir la figure 24). Le mécanisme qui sous-tend ce type de reproduction est inconnu, mais l'hypothèse de l'utilisation d'un acide nucléique semble écartée (voir partie historique).

L'autre contrôle est extrinsèque et cytoplasmique: il ne dépend pas directement des mécanismes de duplication de l'ADN, puisqu'un blastomère énucléé d'étoile de mer peut se diviser et multiplier le nombre de ses centrosomes en l'absence de noyau (Sluder et al., 1986 ; Picard et al., 1988). C'est en fait un contrôle lié à l'horloge du cycle de division cellulaire, avec des phases permissives et des phases non permissives pour la duplication : en effet, des cellules bloquées en phase G0 (Tucker et al., 1979 ; Okuda et al., 2000), G1 (Matsumoto et al., 1999 et une revue pour cette question plus complexe : Balczon, 2000), G2 (Balczon et al., 1995) ou M (Gallant and Nigg, 1992; Hinchcliffe et al., 1998; Lacey et al., 1999; Vidwans et al., 1999) n'assembleront généralement pas de nouveau centrosome, bien que ces phases soient le lieu des évènements de séparation discutés plus haut. En revanche, non seulement les

cellules bloquées en phase S dupliquent leur centrosome, mais, si cette phase est artificiellement prolongée, dans un certain nombre de systèmes expérimentaux (embryonnaires, ; Sluder and Lewis, 1987 ; Raff and Glover, 1988 ou certaines cellules somatiques, Balczon et al., 1995), les centrosomes vont se dupliquer plusieurs fois, ce qui indique que toutes les phases de la duplication peuvent être réalisées dans ces conditions. Néanmoins, la re-duplication a lieu dans des temps qui correspondent à plusieurs fois la durée du cycle cellulaire, ce qui expliquerait que cela ne se produise pas lors d'un cycle normal. Cela rend aussi l'interprétation de ce résultat difficile, car il faudrait connaître l'état exact de cellules bloquées pendant des temps aussi long en phase S. Il est désormais bien établi que l'activité du complexe cycline E/Cdk2 est un élément déterminant de cette permissivité de la phase S (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Meraldi et al., 1999). La recherche de substrat pour ce complexe a conduit à l'identification d'une protéine du nucléole qui se concentre au centrosome en mitose (Zatsepina et al., 1999 ; Okuda et al., 2000) et pourrait jouer un rôle d'inhibiteur de la duplication jusqu'à la transition G1/S, en inhibant la séparation des centrioles. Cette découverte ouvre la voie à de nombreuses hypothèses, mais il reste un certain nombre de contradictions à résoudre (dans les cellules L929 par exemple et dans beaucoup d'autres lignées comme 3T3 ou HeLa, les centrioles sont séparés en G1 mais la duplication ne commence qu'en S). La kinase Mps1, dont le rôle dans la duplication du SPB de *cerevisiae* est déjà connu (Lauze et al., 1995; Winey et al., 1991), semble jouer un rôle similaire chez les vertébrés (Fisk and Winey, 2001). Elle est aussi un substrat de cdk2. Le mécanisme de son action n'est pas connu, mais il pourrait impliquer les centrines (Winey et al., 1991). Tous ces résultats apparus au cours des années 2000 et 2001 sont à considérer avec précaution, car ils sont les premiers de ce type. Certains ont été contredits quelques mois plus tard (le rôle de la nucléoporine et celui de Mps1).

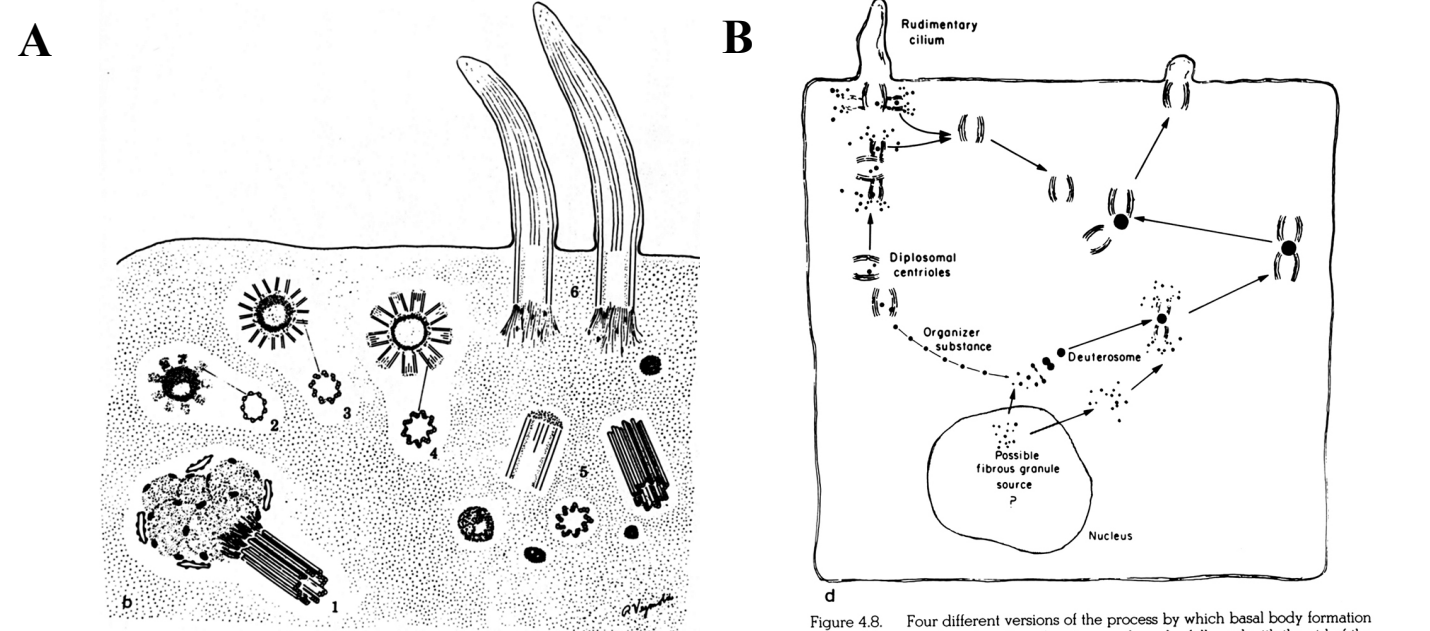
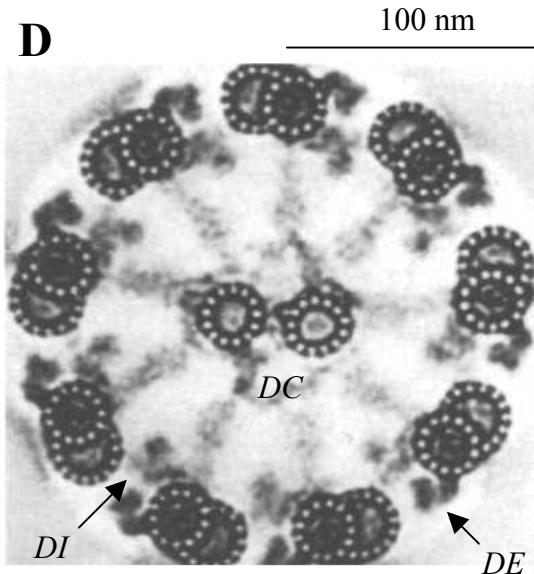
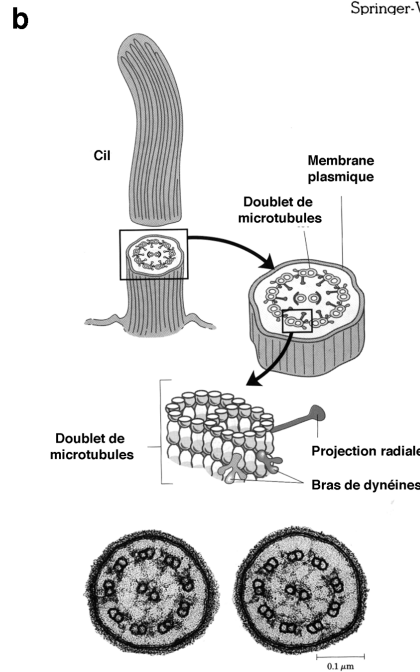
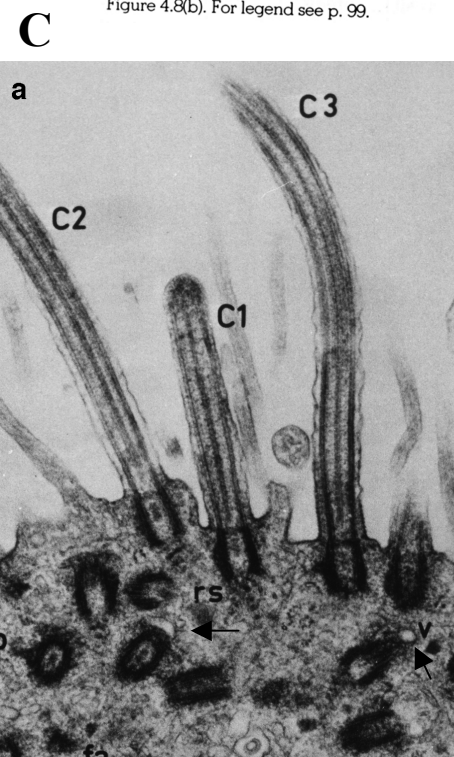


Figure 4.8(b). For legend see p. 99.

Figure 4.8. Four different versions of the process by which basal body formation occurs. Most are relatively self explanatory, and can be followed with the aid of the text. For fuller explanations, refer directly to the reports from which they have been taken. (a). From Sorokin (1968) by permission of the author and Cambridge University Press. (b). From Dirksen (1971) by permission of the author and The Rockefeller University Press. (c). From Kalnins and Porter (1969) by permission of the authors and Springer-Verlag. (d) From Anderson and Brenner (1971) by permission of the authors



## Figure 25 : La ciliogenèse et l'assemblage de novo de centrioles

A: Quelques hypothèses pour l'assemblage des centrioles lors de la ciliogenèse, d'après des études en microscopie électronique (Wheatley, The centriole, 1982). On peut noter l'assemblage de singulets (2), puis de doublets (3) et enfin de triplets (4).

B: Un modèle qui propose les deux alternatives : un véritable assemblage de novo (à droite), ou un assemblage à partir des centrioles de la cellule (à gauche).

C: a) Une image en microscopie électronique de la membrane plasmique d'une cellule en train d'assembler des cils. On peut noter la vacuole au bout de certains centrioles (flèches), qui pourrait indiquer un recrutement de membrane antérieur à l'association à la membrane plasmique (d'après Boisvieux\_Ulrich, 1990). b) Schéma de l'organisation d'un cil (d'après Lehninger et al., 1993).

D: Coupe transversale d'un axonème, avec le doublet central (DC), les doublets de microtubules arrangés comme dans les centrioles (symétrie 9), et les bras de dynéine externe (DE) et interne (DI).

### - Assemblage de novo dans la ciliogenèse

L'assemblage *de novo* désigne une voie d'assemblage qui ne requière pas la présence préalable d'un centriole. Ainsi, le programme de différenciation des épithéliums ciliés déclenche la synthèse de centaines de centrioles, qui serviront de corps basaux (Dirksen, 1991). Cette voie d'assemblage, qui est une marque de différenciation cellulaire (les cellules qui assemblent des centrioles de cette manière sont en général sorties du cycle de division cellulaire), existe chez de nombreux organismes, y compris chez les plantes qui n'ont des centrioles que dans leurs gamètes males ou leurs spores et chez certains unicellulaires qui peuvent passer d'une forme amiboïde acentriolaire à une forme flagellée (voir la partie phylogénie). Il existe aussi un certain nombre d'organismes parfois naturellement parthénogénétiques dont les ovocytes peuvent déclencher l'assemblage de multiples centrioles (chez l'oursin, Kallenbach, 1982 #197 ; ou même chez le lapin, Szollosi and Ozil, 1991). Même chez les mammifères, l'héritage du centrosome dans les premiers stades du développement ne se fait pas toujours de manière classique (un héritage paternel le plus souvent et parfois maternel) et peut donner lieu à un assemblage *de novo* (en particulier chez la souris qui n'assemble des centrioles qu'après le quatrième cycle de division embryonnaire, Szollosi et al., 1972). L'existence d'une telle voie nous renseigne indirectement sur la voie dite classique d'assemblage : la reproduction par duplication est principalement un moyen de contrôler le nombre de centrosomes fabriqués à chaque cycle, et non pas une propriété 'd'autonomie' comme elle avait été décrite par les premiers cytologistes (voir partie historique).

Il existe quelques systèmes modèles pour l'étude de la voie de différenciation menant à la ciliogenèse (Laoukili et al., 2000; Million et al., 1999), mais comme pour les autres voies d'assemblage, on ne sait pas grand chose d'un point de vue moléculaire. La description des étapes en microscopie électronique rappelle la centriologénèse classique : les centrioles ne

s 'assemblent pas n'importe où dans le cytoplasme, mais perpendiculairement à une masse dense (voir la figure 25).

### **- Hypothèses moléculaires**

Il y a jusqu'à présent peu de molécules identifiées qui pourraient jouer un rôle dans l'assemblage des centrosomes. Les molécules connues interviennent dans des mécanismes de contrôle de la duplication et de couplage avec le cycle de division cellulaire. La raison en est peut être qu'un défaut d'assemblage du centrosome ne permet pas la survie cellulaire (hypothèse déjà avancée par Bradfield en 1955, cité par D.N. Wheatley, 1982).

Il y a deux manières d'envisager la question de l'assemblage proprement dit: on peut chercher à décrire comment certaines protéines s'accumulent au centrosome et avec quels partenaires moléculaires elles s'associent, afin d'aboutir à une sorte de 'protocole d'assemblage' ; on peut aussi essayer de dégager les principes d'autoassemblage utilisés.

Comment fabriquer des centrioles ? Ces organites sont faits de microtubules, il leur faut donc de la tubuline et des protéines de nucléation. Ainsi la gamma-tubuline est-elle essentielle dans ce processus (Ruiz et al., 1999), ainsi que d'autres tubulines (Ruiz et al., 2000, Garreau De Loubresse et al., 2001) – ces résultats ont été obtenus chez la paramécie. Le rôle de la centrine n'est pas clairement défini (régulation ou assemblage). Et, si ce rôle est avéré - dans la ciliogénèse chez les vertébrés (Laoukili et al., 2000), ou la flagellogénèse chez les plantes (Klink and Wolniak, 2001), dans la duplication du centrosome chez les levures (Ivanovska and Rose, 2001), et les vertébrés (Middendorp et al., 2000) - le mécanisme qui y est associé reste obscur. Une protéine connue pour son importance dans la structure des axonèmes semble aussi être présente dans les centrioles : la tektine (Dutcher, 1995; Larsson et al., 2000; Steffen et al., 1994; Steffen and Linck, 1988; Stephens, 1995). Elle jouerait un rôle dans la stabilité des ces architectures microtubulaires.

L'assemblage de la matrice péricentriolaire se fait sur des bases mieux connues: elle est liée à l'accumulation de grandes protéines comportant des coiled-coil et un domaine d'adressage au centriole ou au bout moins des microtubules (Gillingham and Munro, 2000; Li et al., 2001; Purohit et al., 2001; Zimmerman and Doxsey, 2000 ; Young et al., 2000). Ces grandes protéines semblent former des réseaux, par oligomérisation, dans lesquels elles concentrent des protéines aux activités diverses. Elles ont tout des 'scaffolding proteins' décrites dans de nombreuses voies de signalisation (grandes protéines avec de nombreux sites de liaison à diverses enzymes). Ainsi la péricentrine s'associe à la gamma-tubuline (Dictenberg et al., 1998) et à la protéine kinase A (PKA, Diviani et al., 2000), et l'AKAP 450 s'associe entre autres à la calmoduline, à la PKA (Witczak et al., 1999) et à la PKC (Diviani and Scott, 2001; Feliciello et al., 2001; Keryer et al., 1993; Witczak et al., 1999).

Une découverte récente a permis d'attribuer à la structure microtubulaire des centrioles un rôle primordial dans l'assemblage de la matrice centrosomienne : si cette structure est désassemblée à l'aide d'un anticorps qui lui est spécifique, le centrosome tout entier se désassemble (Bobinnec et al., 1998a). L'anticorps utilisé n'est pas anodin : il s'agit d'un anticorps dirigé contre une modification post-traductionnelle des tubuline, la polyglutamylation, qui est caractéristique des microtubules neuronaux, centriolaires ou axonémaux (Bobinnec et al., 1998b) - mais, alors qu'il peut y avoir une quinzaine de résidus glutamate sur les microtubules centriolaires ou axonémaux (Fouquet et al., 1994, Geimer et al., 1997), il n'y en a pas plus de six sur les microtubules neuronaux (Edde et al., 1991 ; et pour une revue, Rosenbaum, 2000). Cette modification apparaît aussi sur les microtubules du fuseau mitotique.

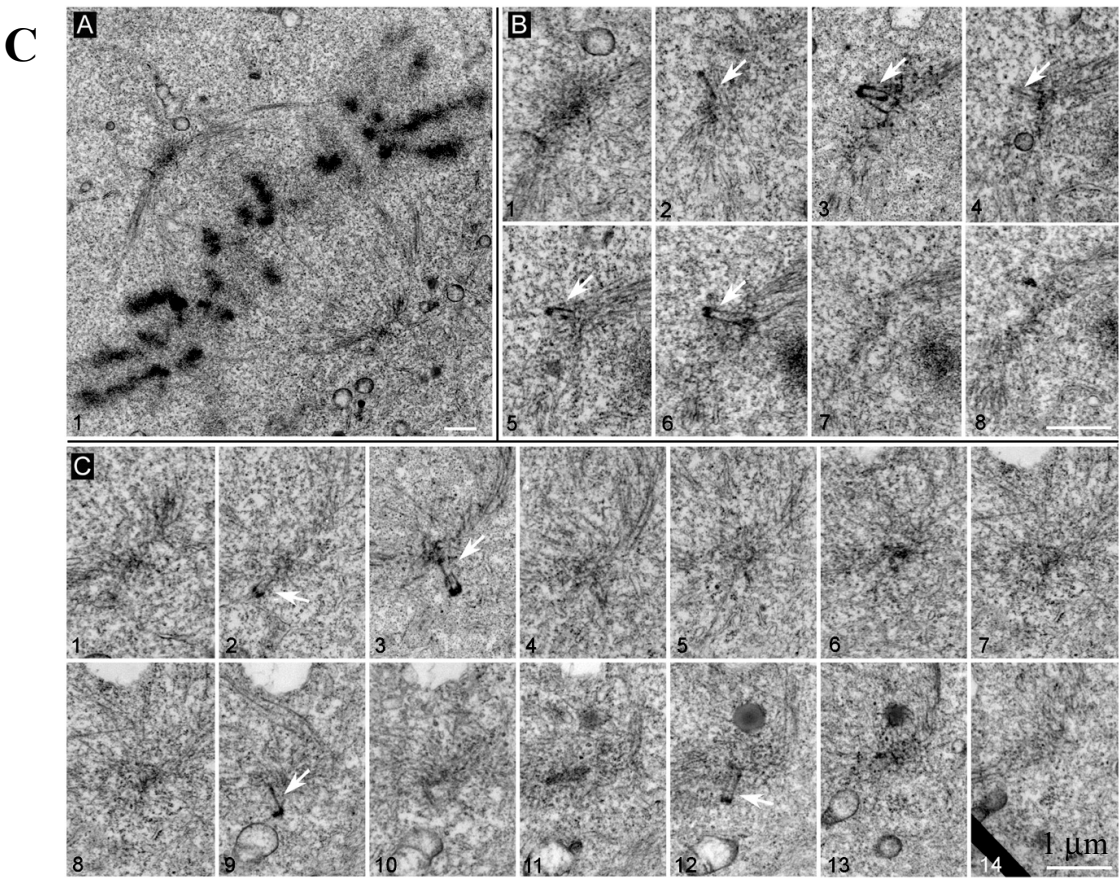
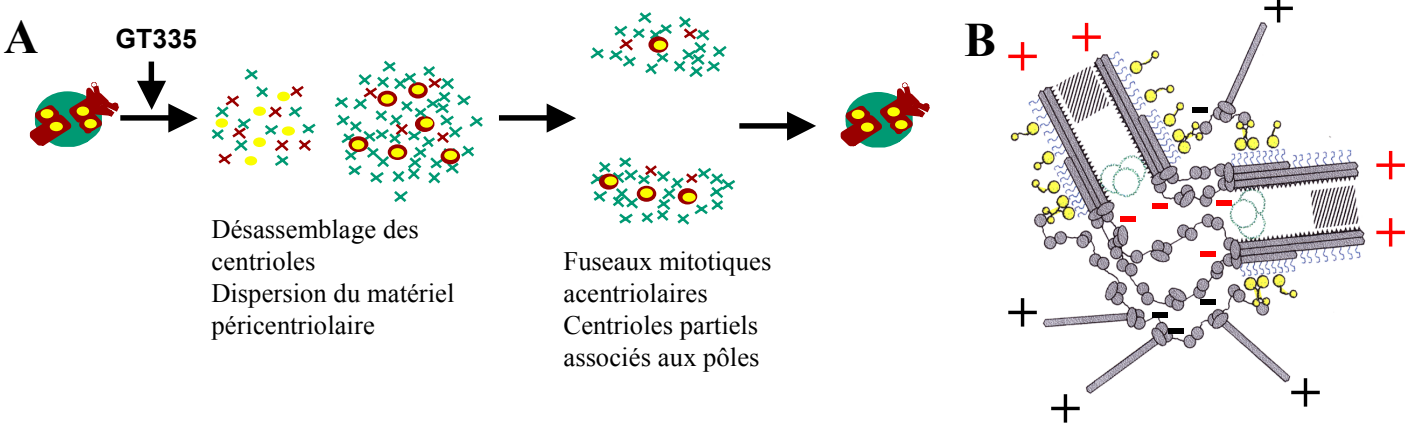
Une caractéristique commune à tous ces microtubules est leur stabilité. Ainsi la polyglutamylation pourrait permettre de recruter des protéines spécifiques qui augmenteraient la stabilité des microtubules centriolaires et leur confèreraient des propriétés particulières





(voir la thèse d'Yves Bobinnec, 1998). Cette modification de la tubuline constituerait donc une des clés de l'assemblage des centrioles, de même qu'elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage des axonèmes (dans ce cas, son rôle est mieux compris). De plus, cette polyglutamylatation pourrait être une marque de l'âge des microtubules et pourrait ainsi contribuer à la différenciation entre les anciens et les nouveaux centrioles, puisque le renouvellement de la tubuline prend plus d'un cycle cellulaire (Kochanski and Borisy, 1990). En effet, il semble que l'affinité de certaines protéines pour les microtubules soit finement régulé par le nombre de glutamates ajoutés : Tau a une préférence pour les microtubules contenant de l' $\alpha$ -tubuline entre trois et cinq glutamates (Boucher et al., 1994 ; Larcher et al., 1996, pour les kinésines).

Un des résultats essentiels de ces expériences de désassemblage des microtubules centriolaires est le suivant : après un temps qui pourrait correspondre à la titration de l'anticorps par les cellules, les centrioles se réassemblent. Ce résultat diffère notablement de celui obtenu après ablation totale des centrosomes par microchirurgie (Maniotis and Schliwa, 1991) ou par laser (Khodjakov and Rieder, 2001) : ils ne réapparaissent jamais. Le fait que le centriole se réassemble après désassemblage par l'anticorps et pas en cas d'ablation totale suggère l'existence d'un complexe qui ne serait pas détruit en cas de désassemblage des seuls microtubules et qui serait nécessaire et suffisant à l'assemblage d'un centriole et par conséquent d'un centrosome (pour une justification assez détaillée de l'existence d'un tel complexe voir Paoletti and Bornens, 1997). Il faut aussi noter que les cellules traitées par l'anticorps ont souvent subi une division avant la réapparition des centrioles. Or elles récupèrent finalement un nombre normal de centrioles, ce qui suggère que ces complexes soient capables de se dupliquer et de se répartir convenablement entre les cellules filles, alors même qu'ils ne peuvent pas organiser de centrosome tant que les microtubules centriolaires sont désassemblés.



**Figure 26 : Modèle centriolaire de l'assemblage du centrosome**

A : Schéma interprétant les résultats de Bobinnec et al. (1998) tiré de la thèse de Yves Bobinnec (1997). Les microtubules des centrioles sont désassemblés suite à l'injection de l'anticorps GT 335 dirigé contre la tubuline polyglutamylée. Cela entraîne le désassemblage de tout le centrosome. Cependant des complexes demeurent assemblés et sont capables de se dupliquer et de s'associer aux pôles du fuseau mitotique pour se répartir équitablement entre les cellules fille. Lorsque l'anticorps se dilue ou est titré par la cellule, les centrioles se reforment à partir de ces complexes.

B : Le modèle moléculaire. Les protéines de bout moins s'associent aux bouts moins stables des centrioles qui nucléent ainsi l'assemblage du centrosome (les boules bleues représentent les complexes d'assemblage des centrioles). La polyglutamylation des microtubules ('poils' bleus) pourrait aussi permettre de recruter des protéines particulières sur les parois des centrioles. Schéma de Y. Bobinnec.

C : Images en microscopie électronique de fuseaux de cellules 60h après l'injection (C), des centrioles partiels sont visibles aux pôles (flèches blanches), alors qu'aucune structure n'était visible à 24h. Dans les cellules acentriolaires, plus de mitoses monopolaires sont observées. Les cellules ont été entièrement examinées en microscopie électronique sur des coupes sériées.

### **- Modèle centriolaire de l'assemblage du centrosome**

L'organisation du centrosome passe donc par la présence de structures microtubulaires stables, ce qui a permis à T. Kuntziger et M. Bornens de proposer le premier modèle convainquant d'assemblage du centrosome (Kuntziger and Bornens, 2000, voir aussi la thèse d'Yves Bobinnec dans laquelle ce modèle est déjà proposé), qui comprendrait une phase de nucléation des centrioles à partir d'un complexe dont la duplication, ou l'activation serait contrôlée et une phase d'autoassemblage impliquant de grandes protéines à coiled-coil formant des oligomères et servant à ancrer et à concentrer diverses protéines, comme les complexes de nucléations des microtubules. Le rôle des microtubules polyglutamylés stables serait de créer des sites stables d'ancrage des protéines : bouts moins de microtubules au bout proximal des centrioles - les grandes 'scaffolding protéins' du centrosome ont souvent une affinité pour les bouts moins, comme des expériences utilisant le taxol pour créer artificiellement des zones riches en bouts moins non centrosomiens l'ont montré (Infante et al., 1999) - bout plus de microtubules au bout distal des centrioles. Certaines protéines ayant une affinité particulière pour les microtubules polyglutamylés pourraient aussi être recrutées le long des parois des centrioles.

Cette idée d'un centrosome organisé à partir des centrioles permet de réconcilier à peu près tous les résultats sur la question : en premier lieu les images de centrosomes isolés et la manière dont la matrice leur est associée (par le bout proximal), mais aussi la possibilité de réassembler des centrosomes dans des extraits cellulaires à partir de centrioles qui ont perdu leur capacité à nucléer des microtubules (Klotz et al., 1990). Dans les expériences réalisées avec des ovocytes ou des extraits d'ovocytes - que ce soit par manipulation, injection ou addition de centrosomes purifiés - à chaque centriole indépendant correspond un aster en interphase et un pôle en mitose. A l'inverse, quand la structure centriolaire est perdue, les

caractéristiques fonctionnelles du centrosome ne sont pas récupérées (Klotz et al., 1990). La disparition des centrioles pendant la myogenèse fournit un exemple physiologique de désassemblage du centrosome, les protéines du matériel péricentriolaire se redistribuant autour du noyau (Tassin et al., 1985).

### **-Conclusion**

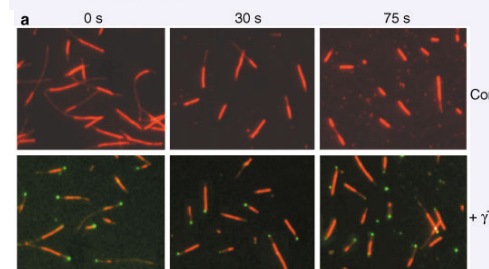
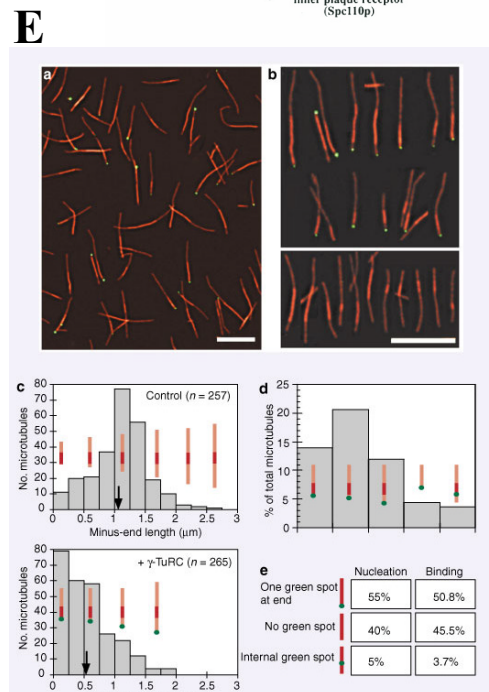
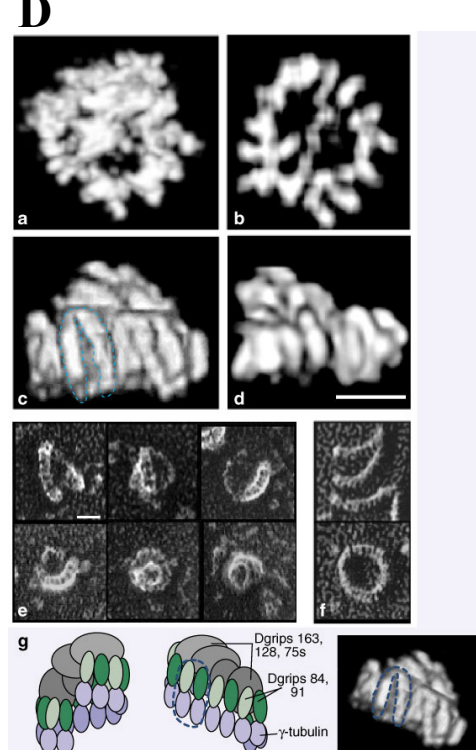
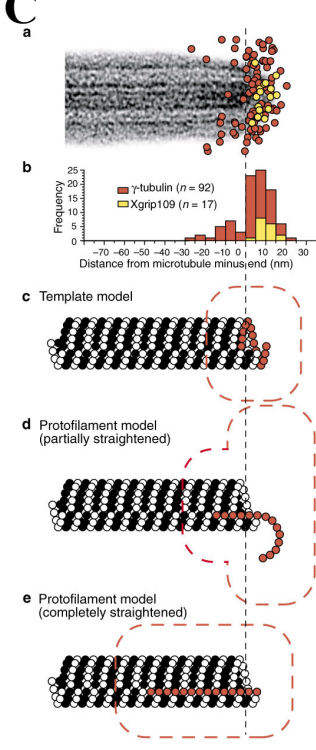
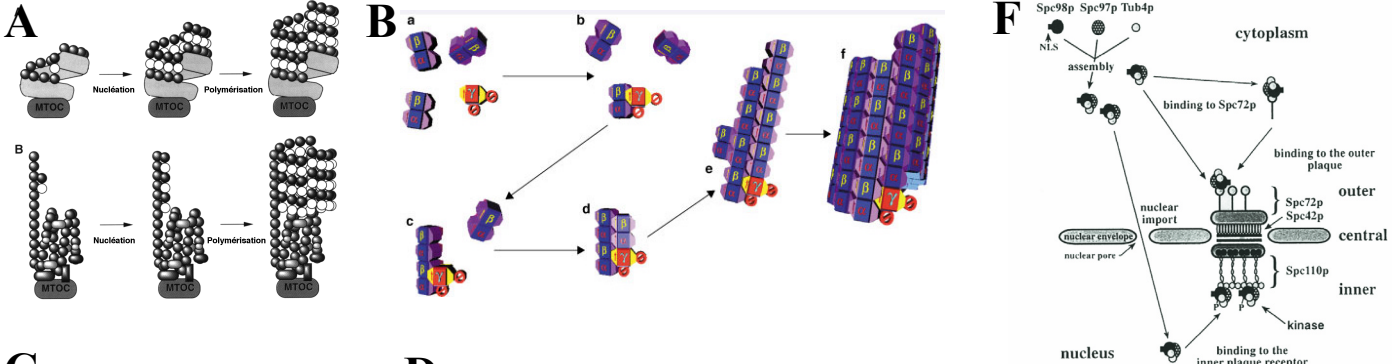
On peut conclure de cette partie qu'il est justifié de définir, comme on l'avait fait à partir de l'ultrastructure, le centrosome des vertébrés par la présence de centrioles, puisque leur présence est nécessaire à sa cohésion et qu'ils constituent la clé de sa reproduction par duplication. Cette duplication est strictement couplée au cycle de division cellulaire. Une autre voie d'assemblage, dite '*de novo*' par opposition à la reproduction par duplication, existe dans certaines voies de différenciation. Un mécanisme d'assemblage a pu être proposé, composé d'une étape de nucléation des microtubules centriolaires à partir d'un complexe hypothétique, suivie d'une phase d'auto-assemblage fondée sur l'oligomérisation de grandes protéines contenant des domaines coiled-coil et des séquences d'adressage. Ce complexe d'assemblage du centriole, bien que non défini pourrait, d'après les résultats de Bobinsec, avoir quelques propriétés particulières : garder son intégrité en l'absence des microtubules centriolaires, se dupliquer et, bien qu'étant incapable de nucléer des microtubules, se répartir équitablement entre les deux cellules filles. Ce complexe défini comme un '*centriolar organizer*' se confondrait, au moins chez les vertébrés, avec le '*polar organizer*'.

### **3. Organisation des microtubules**

Le rôle le moins contesté du centrosome des cellules de vertébré est celui qu'il joue dans l'organisation des microtubules, d'où sa désignation fréquente par l'acronyme MTOC, pour 'microtubule organising center' (centre organisateur des microtubules). On ne présentera pas ici les aspects propres aux microtubules, car ce n'est pas l'objet de cette thèse. On pourra se rapporter aux revues (Dutcher, 2001; Hunter and Wordeman, 2000; Oakley, 2000a; Rosenbaum, 2000) et aux thèses (Thomas Kuntziger, 2001 ; Nicolas Caudron, 2001) qui en traitent plus spécifiquement. De plus, pour ce qui suit, il n'y a pas besoin d'en savoir beaucoup plus que ce qui figure dans les ouvrages généraux de biologie cellulaire.

### **- Mécanismes de nucléation des microtubules**

Après dix ans d'études variées (voir pour une revue, Oakley, 2000b), incluant de la génétique, de la biochimie, l'utilisation d'anticorps et de systèmes a-cellulaires (centrosomes isolés et extraits d'ovocyte), il est aujourd'hui admis qu'un complexe très conservé au sein des eucaryotes est à l'origine de la nucléation des microtubules dans le contexte cellulaire – contexte dans lequel les microtubules ne s'assemblent pas spontanément, soit que la concentration de dimères d' $\alpha/\beta$  tubuline soit trop faible (dans les cellules somatiques, Mitchison and Kirschner, 1984b), soit que les microtubules naissants soient activement dépolymérisés (dans les ovocytes de xénope par exemple, Desai et al., 1999; McNally and Thomas, 1998). Ce complexe comprend une sous-unité tetramérique (deux molécules de  $\gamma$ -tubuline, une molécule d'un homologue de Spc98, et une molécule d'un homologue de Spc97- noms donnés à ces protéines dans la levure *Saccharomices cerevisiae* où elles ont été caractérisées en premier). Plusieurs de ces complexes (appelés  $\gamma$ -TuSC, pour ' $\gamma$ -tubulin small complex') peuvent s'assembler à d'autres protéines pour former un grand complexe connu chez beaucoup d'eucaryotes sous le nom de  $\gamma$ -tubulin ring complexe ou  $\gamma$ -TuRC (Oegema et al., 1999). Les protéines qui forment ce complexe purifié d'abord chez le xénope (Zheng et



**Figure 27 : Le  $\gamma$ -TuRC**

A : Les deux modèles de nucléation par le  $\gamma$ -TuRC.

B : Modèle pour expliquer la nucléation par une molécule de  $\gamma$ -tubuline unique (Erickson, 2001), en tenant compte de ses interactions particulières avec le dimère d' $\alpha/\beta$ -tubuline.

C : Expérience de Keating et Borisy (2001) pour localiser les composants du  $\gamma$ -TuRC au bout des microtubules. Cet article favorise le modèle de 'patron'.

D : Reconstruction par tomographie de la structure du  $\gamma$ -TuRC par Moritz et al. (2001). Cet article propose aussi un modèle de 'patron'.

E : Le travail de Wiese et Zheng (2001) montre clairement le rôle de stabilisation des bouts moins que joue le  $\gamma$ -TuRC : il empêche la polymérisation à ce bout (haut), mais retarde aussi la dépolymérisation (bas).

F : Un autre mystère de ce complexe : il est présent sous forme soluble dans tout le cytoplasme mais n'est actif qu'une fois associé à certaines structures : ici l'exemple de la levure *S.cerevisiae* qui a deux site d'ancrage du complexe associé à la  $\gamma$ -tubuline (tub 4), la plaque cytoplasmique et la plaque nucléaire du SPB (Knop et Schiebel, 1998).

al., 1995) puis chez la drosophile (Oegema et al., 1999) ont des homologues identifiés dans toutes les espèces modèles de métazoaire (entre autres l'humain, Tassin et al., 1998 ; Murphy et al., 1998 ; pour des revues voir Schiebel, 2000 et Gunawardane et al., 2000).

Plusieurs types d'études ont permis de proposer un modèle expliquant le rôle de ce complexe dans la nucléation des microtubules : d'abord des études en microscopie électronique ont révélé la forme très suggestive du complexe, présent dans le matériel péricentriolaire. Il comporte des sous-unités (entre 10 et 14), agencées en anneau, d'un diamètre équivalent à celui d'un microtubule à treize protofilaments (Zheng et al., 1995). Comme les microtubules nucléés spontanément à partir de tubuline purifiée ont en moyenne quatorze protofilaments (de treize à quinze ; pour une revue sur les microtubules voir Desai and Mitchison, 1997), alors que le nombre de protofilaments est très strictement treize pour des microtubules nucléés par le centrosome (Evans et al., 1985), il a été proposé un modèle à première vue très simple : une sorte de patron de microtubule (voir la figure 27). Ce patron serait composé d'une tubuline particulière qui, en interaction avec d'autres protéines formerait un anneau stable et serait capable d'interagir avec des dimères d' $\alpha/\beta$  tubuline, permettant la polymérisation des protofilaments.

Plus récemment, toujours grâce à la microscopie électronique, plusieurs groupes ont confirmé une localisation en bout de microtubule (Keating and Borisy, 2000; Moritz et al., 2000; Wiese and Zheng, 2000), sous forme d'une sorte de chapeau. Ces articles fixent à douze ou quatorze le nombre de molécules de  $\gamma$ -tubuline par complexe, dont deux se chevaucheraient. Tous ces arguments semblaient annoncer la fin de l'hypothèse alternative d'un anneau capable de se déplier pour former une amorce de protofilament (voir la figure 27). Cette hypothèse était soutenue par des études biochimiques qui ont révélé une interaction plus probablement latérale entre la  $\gamma$ -tubuline et le dimère  $\alpha/\beta$  (Llanos et al., 1999) et par des analogies avec la polymérisation de la protéine bactérienne FtsZ (Erickson, 2000a). Des études biochimiques



récentes ont par ailleurs montré que la gamma tubuline seule semblait pouvoir abaisser la concentration critique de nucléation quasiment aussi bien que le complexe tout entier (Leguy et al., 2000), remettant en scelle l'hypothèse du protofilament (Erickson, 2000b et une revue générale sur ces questions).

Quel que soit le complexe, la capacité d'abaissement de la concentration critique de polymérisation n'est pas suffisante pour rendre compte des performances de nucléation du centrosome (abaissée d'un facteur 2 par la  $\gamma$ -tubuline, Leguy et al., 2000; et d'un facteur 5 pour le centrosome, Mitchison and Kirschner, 1984b). De plus, des suppressions de la  $\gamma$ -tubuline dans diverses espèces n'ont pas abouti au phénotype attendu : le centrosome garde toujours une certaine capacité de nucléation (Bobinnec et al., 2000; Strome et al., 2001). Il faut préciser que ces études ont été réalisées chez *C.elegans* dont le gène de  $\gamma$ -tubuline a beaucoup divergé, peut-être justement en raison de l'existence d'un mécanisme alternatif de nucléation des microtubules chez ce vers.

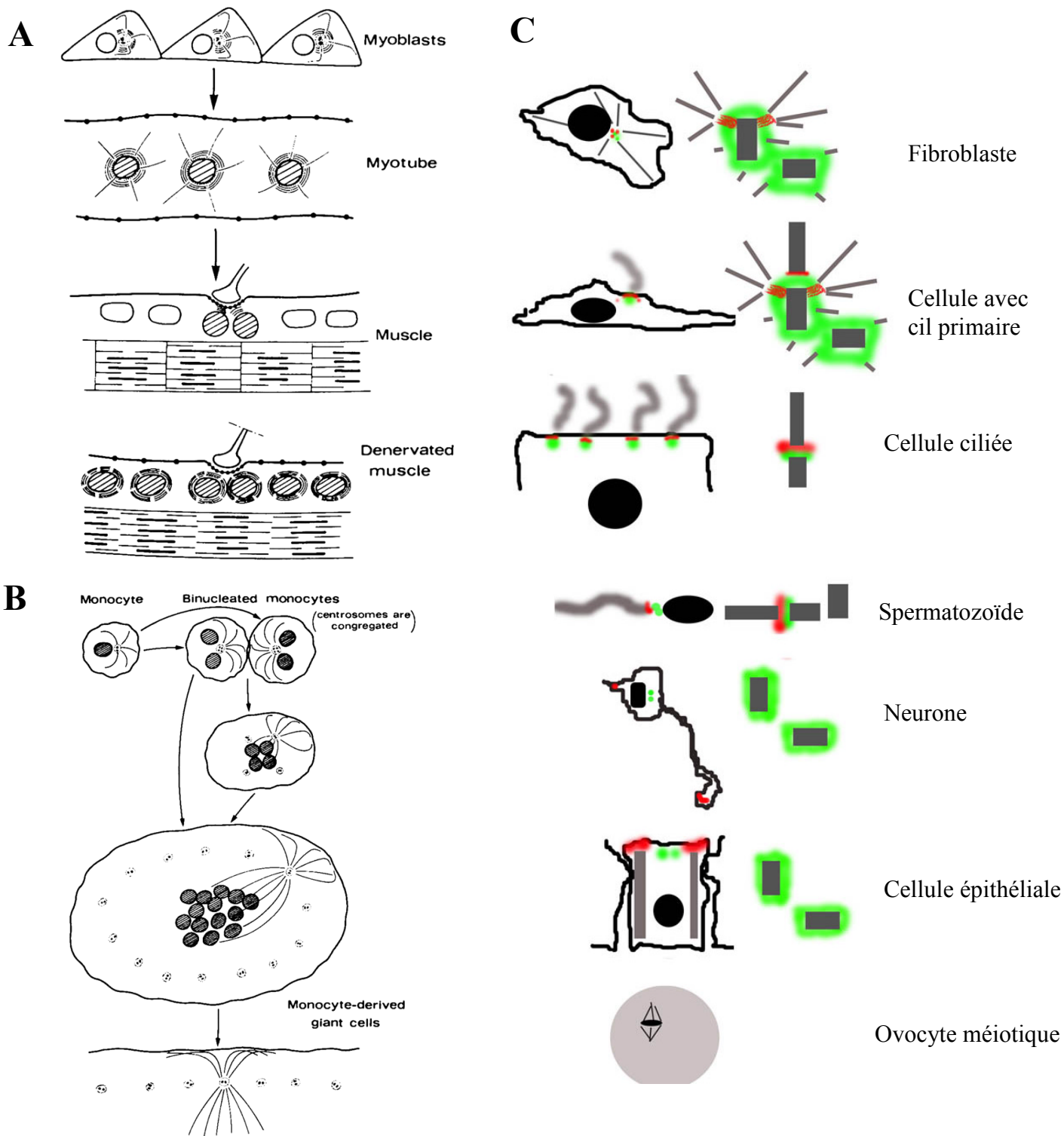
La question de la capacité de nucléation des centrosomes n'est donc pas tout à fait résolue et le  $\gamma$ -TuRC, s'il est toujours associée aux bouts moins des microtubules et s'il a été démontré de manière convaincante qu'il les stabilise (Wiese and Zheng, 2000), ne constitue peut-être pas l'alpha et l'oméga de la nucléation. Cette capacité pourrait être accrue au niveau du centrosome par d'autres mécanismes que la concentration de  $\gamma$ -tubuline, comme par exemple un pouvoir de concentration des dimères de tubuline (Meda et al., 1997), ou l'existence d'amorces de microtubules stabilisées (mais la microscopie électronique semble contredire cette hypothèse). Un mécanisme alternatif à la simple nucléation par un patron a été proposé sur la base de résultats biochimiques (voir la thèse de Nicolas Caudron, 2001 ainsi que Carlier et al., 1997 ; Caudron et al., 2000). Ces études suggèrent l'importance d'intermédiaires de nucléation composés d'oligomères de tubuline. Il semble par ailleurs qu'il existe des complexes qui ne contiennent pas de  $\gamma$ -tubuline et qui favorisent la nucléation des

microtubules en mitose aussi bien qu'en interphase (Lee et al., 2001; Popov et al., 2001; Vasquez et al., 1999).

Ainsi on peut penser que le  $\gamma$ -TuRC n'est pas suffisant pour expliquer la nucléation centrosomienne et qu'il a peut être plutôt un rôle de stabilisation des bouts moins des microtubules nucléés, qui, s'ils étaient libres, se désassembleraient rapidement (Wiese and Zheng, 2000). Le  $\gamma$ -TuRC pourrait aussi avoir un rôle d'ancrage des bouts moins au centrosome, par sa sous-unité de 210 kD (Zhang et al., 2000), propriété centrosomienne responsable de la formation de l'aster polarisé caractéristique d'un certain nombre de types cellulaires. Une autre question ouverte concernant le  $\gamma$ -TuRC est celle de son assemblage et surtout de la régulation de son activité : il est en effet présent en grande quantité dans le cytoplasme des cellules sans pour autant provoquer systématiquement la nucléation ou l'ancrage de microtubules là où il est présent (Moudjou et al., 1996). Il n'existe jusqu'à présent qu'une protéine connue inhibant spécifiquement l'étape de nucléation : MINUS (Fanara et al., 1999).

### **- Régulations de la nucléation et de l'ancrage des microtubules au cours du cycle de division cellulaire et de la différenciation**

De profonds remaniements du cytosquelette microtubulaire interviennent fréquemment dans la vie cellulaire et le bel aster centré sur le centrosome est loin d'être l'unique organisation adoptée par la cellule. Dans ce contexte, une question importante est celle du contrôle spatial et temporel de la nucléation et de l'ancrage des microtubules (pour des revues Mogensen, 1999 et Keating and Borisy, 1999). La dynamique propre de ces polymères assure ensuite un renouvellement rapide du réseau en fonction des nouveaux points d'ancrage des bouts plus et des bouts moins (Saxton et al., 1984 ; Kirschner and Mitchison, 1986b). Les deux principaux cadres de ces remaniement sont la mitose et la différenciation cellulaire.



### Figure 28 : Les centrosomes des cellules de vertébré

A : Différenciation des myoblastes (figure de Bornens, 1991, d'après le travail de Tassin et al., 1985). Après fusion des myoblastes, les centrosomes sont désassemblés et le matériel péricentriolaire se redistribue autour des noyaux. Le myotube ne migre pas et ne se divisera plus.

B : Différenciation des monocytes (Bornens, 1991, d'après Moudjou et al. 1989). Les monocytes peuvent fusionner pour donner des cellules géantes. Les centrosomes se redistribuent uniformément autour de la cellule. Ces cellules migrent et peuvent redonner des monocytes par division amitotique.

C : Quelques exemples de variations sur le thème de la nucléation et de la capture des microtubules. En vert les régions nucléatrices, en rouge les zones d'ancrage des bouts moins des microtubules.

Le schéma de la figure 28 montre un certain nombre d'organisations observées dans des types cellulaires courants : certaines cellules épithéliales assemblent des sortes de piliers de microtubules séparés du centrosome, qui sont à l'origine de la forme allongée de ces cellules et peuvent avoir un rôle mécanique important (dans l'oreille interne, Tucker et al., 1992 ; Tucker et al., 1993). Ils servent aussi aux transports de vésicules de la région apicale vers la région basale (Mays et al., 1994). L'étude de la différenciation *in vitro* des cellules MDCK a permis de réaliser une description très minutieuse des différentes étapes du remaniement du cytosquelette : après la formation des premières jonctions, les centrioles se séparent, puis les microtubules se regroupent autour du noyau, enfin les centrosomes migrent sous la membrane apicale (le centriole père va ensuite nucléer un cil primaire) et les microtubules s'organisent en deux ensembles, une couronne proche de la région apicale et des faisceaux qui vont de la région apicale à la région basale (Bacallao et al., 1989). Dans ces cellules, le centrosome est associé à très peu de microtubules et il semble que de nombreux microtubules soient nucléés dans la région de l'appareil de Golgi (Bre et al., 1987; Bre et al., 1990; Buendia et al., 1990). Les cellules neuronales n'ancrent pas non plus leurs microtubules au centrosome. Ils sont nucléés au niveau du centrosome puis acheminés vers les axones et les dendrites au bout desquels ils pourront être ancrés (revue dans Baas, 1997). Dans les myotubes, les centrosomes sont complètement désassemblés et l'ancrage et la nucléation des microtubules s'effectue à la périphérie des noyaux (Tassin et al., 1985). Le contact entre les microtubules et le centrosome n'est pas perdu dans toutes les cellules différenciées : dans les polymorphonucléaires, cellules très mobiles du système immunitaire, tous les microtubules sont ancrés sur le centrosome et leur nombre, une trentaine, semble assez fixe (Pryzwansky et al., 1983). Ils sont étroitement associés aux deux centrioles qui, dans ces cellules, comme dans les cellules épithéliales, peuvent considérablement s'éloigner l'un de l'autre en réponse à une stimulation chimique (par des facteurs chimiotactiques, Schliwa et al., 1982 ; ou du TPA, Schliwa et al., 1983). La

spermatogenèse implique, en plus de l'assemblage d'un axonème, la formation d'une structure microtubulaire spécialisée qui enserre le noyau et semble importante pour sa morphogenèse (Rattner and Brinkley, 1972) ; enfin de nombreux types cellulaires assemblent des cils.

Dans les cellules de type fibroblastique ou dans certains types cellulaires épithéliaux, l'organisation est classique, avec les bouts moins ancrés au centrosome. Néanmoins, selon les types cellulaires et les conditions de culture, le centrosome peut relâcher une proportion variable de microtubules (Keating et al., 1997; Vorobjev et al., 1997). Ces microtubules peuvent avoir un bout moins stabilisé, auquel cas ils restent stables et sont transportés vers la périphérie cellulaire ou bien ils peuvent être rapidement dépolymérisés, ce qui contribue pour une part importante au renouvellement des microtubules de l'aster (Vorobjev et al., 1999). De plus, des microtubules peuvent être nucléés à partir d'autres structures, comme les membranes golgiennes (Chabin-Brion et al., 2001). Ainsi, même dans ces cellules à l'organisation 'classique', la population de microtubules non ancrés au centrosome peut atteindre une proportion de 75% (pour une revue voir Keating and Borisy, 1999).

Il y a un certain nombre de principes communs à ces réarrangements : la polarité des microtubules est soigneusement contrôlée, grâce à des jeux de complexes moléculaires spécialisés soit dans l'ancrage des bouts moins, soit dans celui des bouts plus (Schroer, 2001). Par exemple, dans une cellule épithéliale différenciée, les bouts moins sont du côté apical et les bouts plus du côté basal.

On peut aussi noter que, le plus souvent, le centrosome reste le principale lieu de nucléation des microtubules (sauf dans la myogenèse, au cours de laquelle il est désassemblé). Et cela même quand les microtubules ne restent pas ancrés au centrosome, donnant l'illusion de son inactivité (Ahmad, 1994; Yu, 1993). Cela a été démontré dans les neurones en bloquant l'activité d'une enzyme responsable de la dissociation des microtubules nucléés au

centrosome, la katanine - tous les microtubules restent alors accrochés au centrosome (Ahmad et al., 1999 ; pour une revue sur la katanine voir Quarmby, 2000) - et dans des cellules épithéliales particulières en suivant leur différenciation *in vivo* (Henderson et al., 1994; Tucker et al., 1995). Cette propriété est très intrigante et a justifiée l'utilisation du terme MTNC (proposé par M.Moudjou dans sa thèse, 1996). En effet, si les complexes  $\gamma$ -TuRC sont bien responsables de la nucléation des microtubules et s'ils sont présents dans le cytoplasme et peuvent s'ancrer sur diverses protéines, pourquoi faudrait-il qu'ils ne fonctionnent qu'au centrosome ? Ainsi le centrosome, s'il n'est pas toujours impliqué dans l'organisation des microtubules, semble être le principale lieu de leur nucléation. On peut imaginer que la localisation stricte de la nucléation des microtubules au niveau du centrosome reflète l'existence d'un mécanisme de régulation de la nucléation au niveau cellulaire qui passerait par une intégration de divers signaux. Le centrosome serait alors le lieu de nucléation non pas parce que cela est nécessaire au mécanisme même de nucléation mais parce qu'il est le lieu privilégié de l'intégration de ces signaux (il y a un centro-some parce que l'organisation radiale est favorable dans certains types cellulaires qui ont une symétrie 'sphérique' en ce qui concerne certaines fonctions).

Une cellule qui se divise va aussi complètement modifier l'organisation de ses microtubules pour former un fuseau qui servira à la séparation des chromosomes et à la détermination du plan de division de la cellule (Rappaport, 1971, 1985, 1986 ;Rappaport and Rappaport, 1974 ; Oegema and Mitchison, 1997). Si on se limite aux questions de nucléation et d'ancrage, on retrouve les mêmes principes : des sites d'ancrage des bouts plus (les kinétochores) sont associées aux centromères des chromosomes et contiennent des complexes similaires aux complexes habituellement utilisés à la membrane plasmique, contenant le moteur de bout

moins dynéine (Schroer, 2001 ; Banks and Heald, 2001), les bouts moins étant ancrés au niveau des pôles qui contiennent les centrosomes.

Les protéines qui semblent assurer la cohésion au bout moins sont mieux connues en mitose qu'en interphase : elles sont des moteurs (Vernos et al., 1995) ou des protéines capables de former des oligomères (Merdes et al., 1996) qui se concentrent au bout moins des microtubules grâce à des moteurs (Merdes et al., 2000) et sont importantes pour focaliser le pôle du fuseau (Gordon et al., 2001; Gruss et al., 2001; Nachury et al., 2001 ; Wiese et al., 2001). La nucléation se fait principalement au niveau du centrosome et y est renforcée par rapport à l'interphase (Kuriyama and Borisy, 1981b), peut-être grâce au recrutement de complexes contenant la  $\gamma$ -tubuline au moment de l'entrée en mitose (Khodjakov and Rieder, 1999). Elle peut aussi avoir lieu au niveau de la chromatine (Carazo-Salas et al., 1999).

Il faut aussi noter une organisation tout à fait particulière de la région centrosomienne : du côté faisant face aux chromosomes, une masse importante constituée de protéines de nucléation et d'ancrage des bouts moins se détache un peu des centrioles proprement dits (dans certains systèmes, il arrive que les centrioles se détachent tout à fait, les fuseaux restant fonctionnels, ce qui suggère une indépendance de cette matrice vis à vis des centrioles), dans les autres directions partent des microtubules qui émanent du matériel péri-centriolaire à proprement parler et qui s'étendent jusqu'au cortex où ils sont ancrés par des complexes de bout plus (Busson et al., 1998; Dujardin et al., 1998). Ce sont les microtubules dit astraux, qui disparaissent en l'absence de centrosome, contrairement aux microtubules du fuseau (Khodjakov et al., 2000). Ainsi le centrosome/corpuscule fusorial a un aspect stratifié à ce stade du cycle de division cellulaire, ressemblant plus à son homologue chez les levures (voir partie phylogénie et Kuntziger et al., 2001b).

Il faut noter que, dans tous les cas, les structures microtubulaires, même quand elles ne sont pas à l'origine de la forme particulière de la cellule, respectent sa symétrie. Par exemple, les

myotubes qui ont une symétrie cylindrique, n'ont plus de centrosome. L'organisation en aster est avant tout le reflet d'une symétrie générale de la cellule, de type sphérique. L'organisation des microtubules correspond à un choix général de symétrie. C'est particulièrement frappant chez les levures : les levures *S.cerevisiae*, qui sont sphériques ou polarisées quand elles forment un bourgeon ou conjuguent, ont un unique point de nucléation sur le noyau, formant un sorte d'aster, alors que les levures *S.pombe*, qui ont une forme cylindrique ont plusieurs points d'ancrage des microtubules sur leur noyau qui forment des faisceaux parallèles et alignés selon l'axe de la cellule. Il est clair dans ce cas que la forme de la cellule guide l'organisation des microtubules mais aussi qu'ils sont aussi responsables de cette forme particulière. Des mutants qui ne sont pas capables d'organiser leurs microtubules en faisceau façon ne gardent pas leur forme cylindrique (Verde et al., 1995 ; Fisher and Sawin, 1998). Il est aussi frappant de constater que lorsque cette levure conjugue et qu'elle se polarise, l'organisation des microtubules prend une forme d'aster.

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

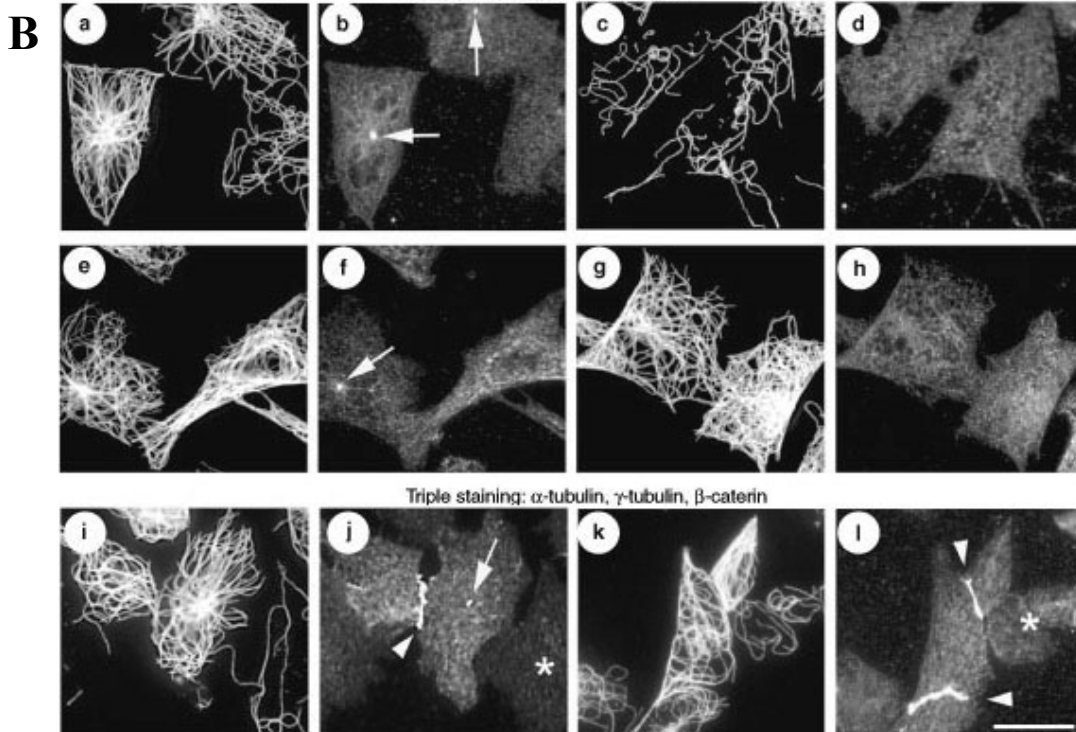
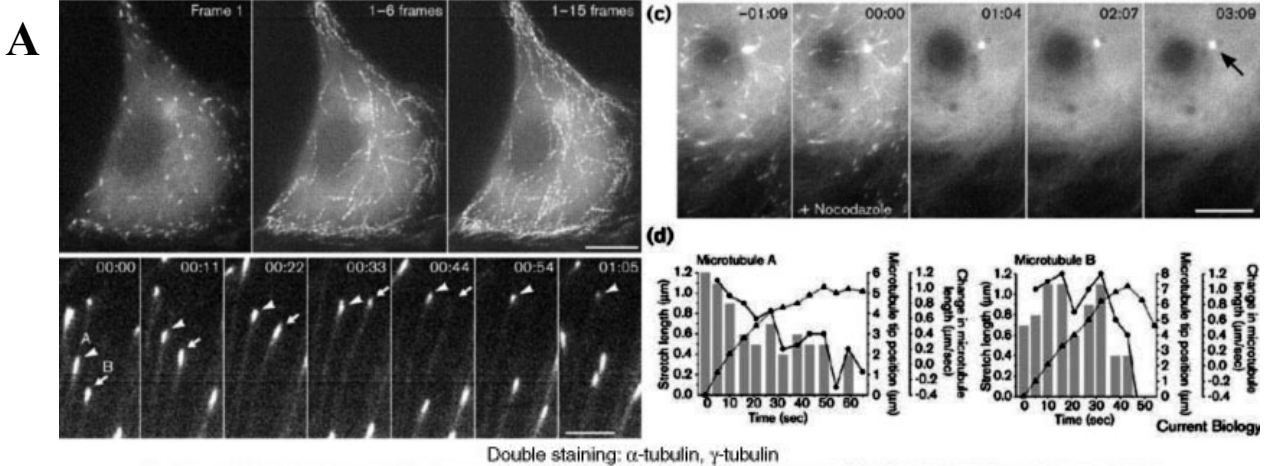
Une propriété primordiale des microtubules n'a pas encore été abordée : leur dynamique. La propriété des microtubules d'alterner des phases de polymérisation et des phases de dépolymérisation leur est intrinsèque mais les paramètres de cette dynamique sont contrôlés au niveau cellulaire (le plus souvent les fréquences de transition entre ces deux phases, mais aussi les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation).

La plupart de ces activités de régulation sont dues à des protéines cytoplasmiques sans rapport direct avec le centrosome. Il en existe un nombre important et des études en vidéo-microscopie ont permis de déterminer l'action de chacune sur les paramètres de la dynamique microtubulaire, en général dans des extraits acellulaires (pour des revues récentes voir Hunter and Wordeman, 2000; Walczak, 2000; Wittmann et al., 2001).



## Composants des complexes de bout plus des microtubules

Protein	Budding yeast ( <i>S. cerevisiae</i> )	Fission yeast ( <i>S. pombe</i> )	<i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i>	<i>Neurospora</i> <i>crassa</i>	<i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>
CLIP-170	Bik1	tip1			D-CLIP-190
EB1	Yeb1/Bim1	mal3			EB1 family
Dynein heavy chain	Dhc1/Dyn1		NUDA	RO1	Dhc
Dynactin p150	Nip100		RO3		p150Glued
LIS-1	Pac1		NUDF		D-Lis1
APC	Not present				
NUDE			NUDE	RO11	
NUDC			NUDC		APC family



### Figure 29 : La régulation de la dynamique des bouts plus des microtubules

Table : les protéines de bout plus des microtubules sont souvent très conservées (Schroer, 2001).

A : EB1 couplée à la GFP se lie aux bouts plus des microtubules dynamiquement. Un traitement à faible dose de nocodazole ne dépolymérise pas les microtubules, mais dissocie EB1 de leur bout plus (EB1 se concentre alors au centrosome, c, flèche noire). C'est un très bon outil pour estimer la dynamique des microtubules (d). Figure de Mimory-Kiyosue et al. (2000).

B : La surexpression de la N-cadhérine dans des cytoplastes dépourvus de centrosome change la stabilité de leurs microtubules : comparer les images a et c aux images i et k. Les flèches indiquent soit les centrosomes, soit les jonctions cellulaires. Figure de Chausovsky et Al. (2001).

Il en est principalement de deux types : les MAPs pour 'microtubule associated protein', qui se lient tout au long des microtubules (MAP1, MAP2 ou Tau sont les plus connues, mais aussi les différentes MAPs du xénope comme XMAP215, ou l'originale STOP qui confère une résistance au froid, Job et al., 1982) ou bien préférentiellement à un bout (comme EB1, voir Tirnauer and Bierer, 2000). Elles ont généralement un rôle stabilisateur. A l'inverse, certains moteurs moléculaires ont plutôt un rôle de déstabilisation (l'exemple le mieux caractérisé est XKCM1 qui est une kinésine et agit au bout plus des microtubules, Desai et al., 1999; Walczak et al., 1996). D'autres molécules agissent sur la dynamique des microtubules en se liant à la tubuline libre, comme la stathmine (Andersen, 2000).

L'état de la dynamique dépend de l'activation ou de l'inactivation de ces protéines en fonction de la phase du cycle (un cas original dans Tournebize et al., 2000) et de l'environnement cellulaire (via les MARKs, pour microtubule-affinity-regulating kinase, Drewes et al., 1998). Les MAPs sont en général inhibées lors de l'entrée en mitose, leur phosphorylation par la cycline mitotique entraînant une diminution de leur affinité pour les microtubules. Ainsi les microtubules sont plus stables en interphase qu'en mitose, et plus stables encore dans des cellules interphasiques ayant formé avec leurs voisines des liaisons via la cadhérine (Chausovsky et al., 2000). La tubuline des microtubules relâchés du centrosome lors de la différenciation des cellules épithéliales MDCK est modifiée : elle est détyrosinée (le résidu Tyr est clivé par une enzyme). Ils sont aussi plus stables (Bre et al., 1990).

Il faut noter cependant que le centrosome semble avoir son mot à dire dans cette régulation. Ainsi la stathmine est-elle concentrée au centrosome (Kuntziger et al., 2001a). On y trouve aussi des protéines potentiellement importantes pour la dynamique de bout plus comme EB1 qui est transportée en permanence entre le centrosome et la membrane plasmique via les

microtubules (si la dynamique des microtubules est bloquée, EB1 ne s'associe plus au bout plus et se concentre au centrosome, Mimori-Kiyosue et al., 2000).

Certaines expériences ont permis d'analyser directement le rôle du centrosome en comparant la dynamique des microtubules dans des fragments de cellules possédant ou ne possédant pas de centrosome (Rodionov et al., 1999). Il semble que la présence d'un centrosome favorise un mode dans lequel les microtubules libres sont très vite dépolymérisés par leur bout moins, alors qu'en absence de centrosome, un régime du type 'tapis roulant' est observé - ou 'treadmilling', le bout plus pousse aussi vite que le bout moins se désassemble (Rodionov and Borisy, 1997). Ce contrôle dépend aussi du type cellulaire : en présence de centrosome, dans les fibroblastes, les bouts moins libérés du centrosome sont rapidement dépolymérisés, alors que dans les cellules épithéliales, il semble qu'il soient stabilisés (s'il y a plus de microtubules libres dans les cellules épithéliales, ce n'est donc pas parce qu'il y a plus de microtubules relâchés mais parce que ces microtubules sont stabilisés).

L'importance du contrôle de la dynamique des microtubules pour leurs fonctions cellulaires (théorisé une première fois par Marc Kirschner sous le nom de 'search and capture', Kirschner and Mitchison, 1986a; Kirschner and Schulze, 1986) a été soulignée dans de nombreuses revues. On peut citer quelques exemples des mécanismes dans lesquels ce contrôle est impliqué: le positionnement du noyau ou des chromosomes par la production d'une force de poussée (chez la levure pombe, Tran et al., 2001) ou d'une traction (chez la levure *Cerevisiae*, Adames et Cooper, 2000 ; chez les mammifères, O'Connell and Wang, 2000), la modulation de l'ancrage de la cellule à son substrat (Kaverina et al., 2000; Kaverina et al., 1998, et pour une revue, Geiger and Bershadsky, 2001), la mesure des distances intracellulaires (grâce à l'accumulation des protéines de bout plus lors de leur croissance, hypothèse avancée par P. Nurse).

## **- Conclusion**

L'organisation des microtubules dans les différents types cellulaires et au cours du cycle de division est très versatile, mais repose sur un principe général : la régulation des bouts des microtubules (en général ancrage du bout moins et régulation de la dynamique du bout plus). Le plus souvent la nucléation des microtubules s'effectue au centrosome.

La définition du centrosome par la présence de centrioles permet de parler du centrosome de toutes les cellules de vertébrés. En effet, dans de nombreux types cellulaires le centrosome (corpuscule central) n'est pas au centre et n'est pas forcément associé à un astère de microtubules. Il peut être associé à un axonème (cellules ciliées), ou bien même être libre de toute interaction avec une quelconque structure microtubulaire (neurones, certaines cellules épithéliales). Certains types cellulaires n'ont pas de centrosome (les myotubes, Tassin et al., 1985) ou bien en possèdent un grand nombre (les ostéoclastes, Moudjou et al., 1989).

## **4. Composition moléculaire**

Un inventaire des molécules centrosomiales pourrait à première vue manquer d'intérêt, d'autant que le rôle de cette localisation dans la fonction des protéines n'est souvent pas compris. De plus, l'observation de la localisation d'une protéine au niveau du centrosome, le plus souvent à l'aide d'anticorps sur des cellules fixées, peut recouvrir des réalités très variées. On peut essayer en revanche d'ébaucher une classification des protéines dites centrosomiales, dans le but de mieux cerner l'énorme complexe protéique sans membrane qu'on appelle centrosome (en fait tout simplement le plus gros). Malgré de nombreuses tentatives de rationalisation, la définition de ce qu'est une protéine centrosomiale reste souvent provisoire (pour une discussion sur la définition de ce qu'est une protéine

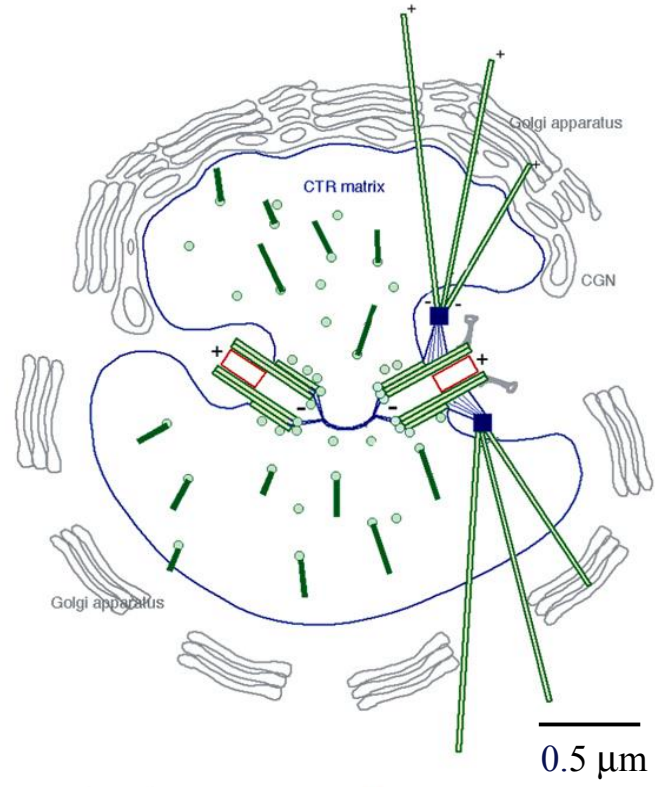
**Centrioles**  
 αβ-tubulin (polyglutamy)  
 δ-tubulin (?),  
 ε-tubulin  
 centrin 1-2/3/4

**Matrice**  
 AKAP 450 (Scaffold)  
 Pericentrin  
 Kendrin  
 PCM-1  
 Ninein (ancrage)  
 C-Nap1/Cep250

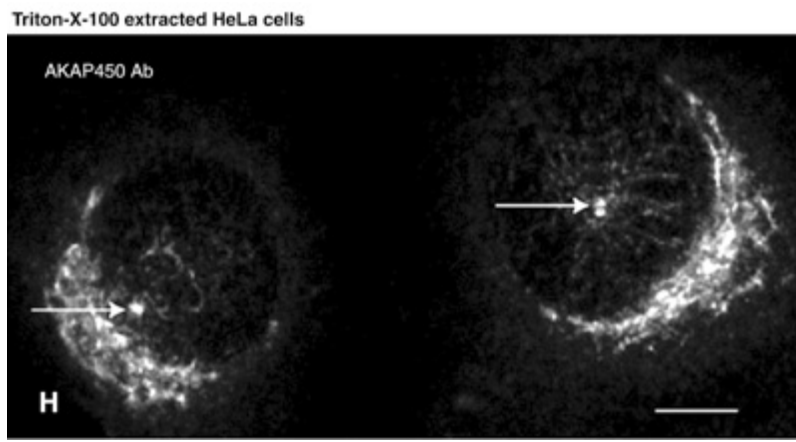
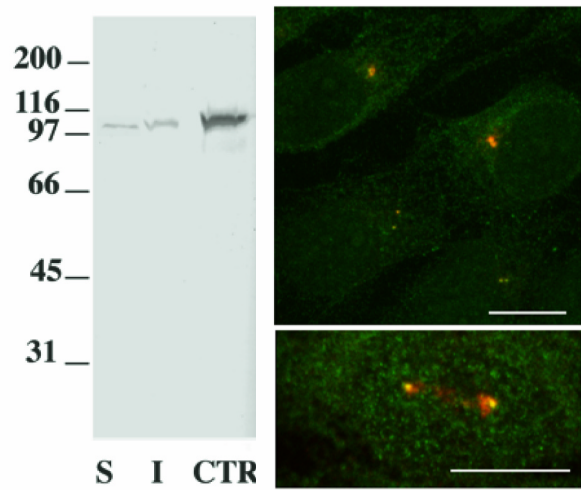
**Centrosphere**  
 AKAP 450  
 GMAP-210  
 (bout moins)  
 GAPCenA

**Complexe de nucléation des microtubules**  
 γ-tubulin, Spc97/98  
 et autres composants du γ-TuRC

**Association au centrosome en fonction du cycle cellulaire**  
 CDK1, Cyclin B1, Sucl  
 Cdc20/fizzy  
 Polo kinase  
 Aurora/Ipl1-related kinases  
 A Kinase type II  
 MAPKs  
 APC/cyclosome  
 PDE4, Ca<sup>++</sup>/Cam kinase  
 PP4  
 Nek-2 (NIMA-like kinase)  
 Ral-binding protein(cytocentrin)  
 RanBPM  
 NuMA  
 Survivin,  
 p21, p53, BRCA1  
 Tankyrase  
 Proteasome  
 Arp1/centractin  
 Myosin V  
 Presenilins,  
 Etc...



	anchored microtubule or centriole microtubule		γ-tubulin complex
	nascent microtubule		centrin-rich luminal structure



**Figure 30 : La complexité moléculaire du centrosome est en rapport avec sa complexité structurale**  
 Le western blot illustre l'existence de protéines solubles (fraction S) mais enrichies au centrosome (CTR). C'est le cas des protéines du γ-TuRC. La localisation au centrosome est montrée sur l'image à droite du western blot (d'après Tassin et al., 1998).  
 La protéine dont la localisation est identifiée grâce à un anticorps sur l'image de droite est l'AKAP 450 qui est présente au centrosome, mais aussi dans la région de l'appareil de Golgi. La flèche indique le centrosome (image de G. Keryer, anticorps de W. Kemner, résultat non publié).

centrosomienne, voir la revue de Michel Bornens, dans *The Centrosome*, 1992). On donnera un exemple pour chaque type de protéine sans chercher à faire une liste exhaustive.

### **- Protéines classées selon leur localisation**

#### *Protéines centriolaires*

La plus évidente des protéines des centrioles est la tubuline qui en constitue les parois : la figure caractéristique des triplets de microtubule permet d'identifier le centriole et donc le centrosome, et s'ils sont désassemblés, le centrosome tout entier se disperse (Bobinnec et al., 1998a).

Le centriole, long de près d'un demi micron comporte différentes régions que l'on peut tout juste distinguer au microscope optique: celle proche des bouts plus (bout distal) et celle proche des bouts moins (bout proximal) des microtubules centriolaires. Ainsi la centrine est une protéine du bout distal, ce qui en fait un excellent marqueur des centrioles, même lorsque ceux-ci sont étroitement associés par leur bout proximal lors de la formation d'un nouveau centriole (voir papier 1 et Paoletti et al., 1996). Cela n'est pas le cas pour la tubuline qui donne des images en bâtonnets, car elle est présente tout au long du centriole. On trouve spécifiquement enrichies au bout proximal des protéines comme C-Nap1, qui semble jouer un rôle dans la régulation de la distance entre les deux centrioles (Fry et al., 1998; Mayor et al., 2000), et qui est régulée par la kinase Nek2 dont l'activité est importante pour la stabilité des centrioles (Uto and Sagata, 2000). S'associent également au bout proximal des protéines qui sont présentes dans toute la matrice et sont en fait des protéines de bout moins des microtubules, comme certaines isoformes de l'AKAP 450 (Keryer et al., 1993).

Enfin, les deux centrioles d'une cellule en G1 ne sont pas équivalents et certaines protéines leur sont spécifiques. En fait, on ne connaît jusqu'à présent que des protéines spécifiques du centriole parental, comme par exemple la ninéine, qui est enrichie au niveau des appendices

subdistaux et semble impliquée dans l'ancrage des bouts moins des microtubules (Mogensen et al., 2000). La fonction des autres protéines du centriole parental, dont la liste s'allonge, n'est pas encore connue (l' $\epsilon$ -tubuline, Chang and Stearns, 2000 ; la cenexine /ODF2, Lange and Gull, 1995; Nakagawa et al., 2001 ).

#### Protéines de la matrice (*matrice proche, lien intercentriolaire, centrosome/Golgi/noyau*)

Le matériel dense aux électrons qui entoure le centrosome est très riche en protéines et la plupart des protéines centrosomiales connues font partie de cet ensemble. En l'absence de membrane, l'extension de ce domaine n'est pas strictement définie. Il y a continuité entre le centrosome et le reste du cytoplasme. On peut en revanche distinguer les protéines de ce groupe selon la distance à laquelle elles se trouvent des centrioles. En effet, certaines protéines restent très proches des parois des centrioles et sont à proprement parler 'péri centriolaires', comme la gamma-tubuline (Moudjou et al., 1996) et les autres composants du  $\gamma$ -TuRC (Tassin et al., 1998), alors que d'autres forment des réseaux qui peuvent s'étendre jusqu'à l'appareil de Golgi et enserrer le noyau, comme l'AKAP450 (Keryer et al., 1999; Schmidt et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Witczak et al., 1999).

#### **- Protéines classées selon leur mode d'assemblage sur le centrosome**

##### Protéines accumulées par les microtubules

Une protéine transportée le long des microtubules par une dynéine (moteur microtubulaire qui se déplace vers les bouts moins) a toutes les chances de se retrouver au centrosome et de s'y concentrer, surtout si elle a une affinité pour les bouts moins des microtubules. Elle sera donc, d'après sa localisation, considérée comme une protéine centrosomiale, sans pour autant posséder de cible spécifique au centrosome.

Ces protéines se dissocient en général du centrosome en l'absence de microtubules (comme la protéine GMAP210, Infante et al., 1999 ; ou la protéine de drosophile nuf, Rothwell et al., 1998). Certaines protéines ont des comportements plus nuancés : le réseau constitué par l'AKAP450 se désagrège si les microtubules sont désassemblés, mais une certaine proportion reste fermement associée au centrosome (Guy Keryer, communication personnelle).

On peut aussi créer artificiellement des sites de concentration de bouts moins stables non-centriolaires, par traitement des cellules au Taxol, drogue de la tubuline qui abaisse sa concentration critique de polymérisation et stabilise les microtubules. Après quelques heures de traitement, les microtubules s'organisent en fagots le plus souvent polarisés. On peut ainsi constater que la plupart des protéines de la matrice centrosomienne ont une affinité pour les bouts moins des microtubules puisqu'elles se relocalisent au bout des fagots (comme la  $\gamma$ -tubuline, Moudjou et al., 1996). Mais elles ont aussi une affinité pour le centrosome puisqu'une partie y reste associée (le centrosome contient aussi des bouts moins stables).

Enfin, les microtubules peuvent avoir un rôle dans l'adressage au centrosome d'une protéine qui y restera ensuite associée indépendamment de leur présence. Cela peut-être estimé en traitant avec du nocodazole ou du taxol des cellules transfectées avec un vecteur permettant la surexpression de la protéine et cela dès le début de l'expression de la protéine exogène. Cette approche a permis de montrer que l'accumulation de la ninéine au centrosome est favorisée par les microtubules, et que cette protéine a une affinité pour les bouts moins, puisqu'un traitement au taxol provoque une concentration au bout de fagots non centrosomiens. En revanche, si on traite une cellule non transfectée au nocodazole ou au taxol, on ne voit aucune modification de la localisation de la ninéine, (résultats non publiés de Miguel Abal et Véronique Boukso-Castaing, voir la discussion du papier 1). Il a été montré par vidéomicroscopie que la péricentrine, une grande protéine du PCM qui ne se dissocie pas du centrosome en absence de microtubules est transportée le long des microtubules sous forme



d'agrégats (Young et al., 2000). Les microtubules, qui sont nucléés par le centrosome, constituent donc un élément important pour le transport des constituant du centrosome - ce qui explique que l'assemblage de microtubules en l'absence de centrosome, dans certaines conditions expérimentales (extraits cellulaires ou cellules en mitose traités au taxol ou déplétés de certaines protéines, ainsi que dans certains types cellulaires en interphase) puisse conduire à l'auto-organisation d'un aster comportant en son centre un complexe formé d'un certain nombre de protéines centrosomiales et qui pourra perdurer après désassemblage des microtubules.

Reste à comprendre comment les protéines ciblées au centrosome s'y assemblent.

#### Protéines qui forment des oligomères

De nombreuses protéines de la matrice péricentriolaire sont de grandes protéines contenant de nombreux domaines 'coiled-coil' (torsades d'hélices) et qui peuvent former des oligomères. Il existe en général plusieurs variants d'épissage de ces protéines, qui peuvent occuper des régions différentes de la matrice. La plus petite protéine à domaine 'coiled-coil' connue est strictement centrosomiale (NP40, 14kD, que du coiled-coil). Comme cet organite est le lieu de toutes les contradictions, de même que tout ce qui se situe aux frontières de la connaissance, il contient aussi une des plus longue protéine sans domaine coiled-coil (Cep 350).

#### Protéines qui ont un site d'ancrage spécifique au centrosome (sur les centrioles ou sur des protéines de la matrice)

Certaines protéines ont des sites d'ancrage spécifiques au centrosome. Ainsi le  $\gamma$ -TuRC, via la péricentrine, s'ancre dans la matrice (Young et al., 2000). De nombreuses protéines de la matrice ont aussi des sites d'interaction directe avec la  $\gamma$ -tubuline ou avec Spc 97/98. Enfin, une séquence consensus contenue dans la région C-terminale de plusieurs protéines à domaine

coiled-coil, a été découvert. Elle permet l'adressage au centrosome et plus précisément au centriole (Gillingham and Munro, 2000). Il est intéressant de savoir que ce fragment, lorsqu'il est surexprimé, se localise au centriole et non pas au bout moins des microtubules, comme c'est le cas pour la protéine entière endogène (estimé à partir d'expériences avec le taxol, comme décrit plus haut, Guy Keryer, communication personnelle). En effet, cela suggère que ces protéines s'ancrent par leur extrémité C-terminale au centriole (peut-être seulement un sous-groupe de variants contenant cette extrémité) mais aussi, par un autre motif, au bout moins des microtubules. La centrine a aussi un site d'ancrage au centriole, et s'y localise indépendamment des microtubules. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la centrine, comme le fragment C-terminal de l'AKAP 450, s'accumule de manière saturable au centriole : quand le niveau d'expression augmente, l'intensité du marquage du centriole varie peu, ce qui suggère un nombre de sites d'ancrage limité (résultats non publiés).

#### Protéines solubles, protéines insolubles

On peut estimer la force de l'ancrage d'une protéine au centrosome en tentant de l'extraire avec des détergents de plus en plus puissants et des concentrations de sels ou d'agents dénaturants de plus en plus élevées. Ainsi certaines protéines sont solubles et d'autres restent ancrées malgré un traitement très dissociant (ce sont les protéines qu'on appelle 'centrosomal core protein', comme la centrine, la tubuline, la nineine...). Il faut noter que la plupart des grandes protéines centrosomiennes sont très insolubles, ce qui rend leur étude difficile.

On a naturellement tendance à s'intéresser plus aux protéines qui ont les affinités les plus grandes pour un complexe donné, alors même que des protéines ayant une affinité très faible peuvent avoir des rôles de régulation très importants. D'autant qu'une protéine qui a deux sites de liaisons très faibles à un constituant d'un gel peuvent avoir une affinité effective très élevée. Toutes les techniques d'estimation des interactions protéiques établissent des seuils de

détection liés à la technique utilisée. S'il est important de pouvoir définir les sites d'interaction et de pouvoir mesurer les paramètres cinétiques de cette interaction, l'importance d'une protéine dans un processus ne peut pas être jugée par sa simple affinité pour un site particulier (comme la matrice centrosomienne).

### *Protéines concentrées au centrosome, protéines modifiées au centrosome*

Un certain nombre de protéines enrichies dans les préparations de centrosomes purifiés existent aussi à l'état soluble, parfois en grande quantité, dans le cytoplasme. On peut alors se demander si c'est une isoforme qui est concentrée au centrosome et si l'activité de cette protéine est modifiée par sa localisation. C'est clairement le cas pour la tubuline centriolaire : cette protéine très abondante dans toute la cellule est modifiée dans les centrioles par une enzyme qui lui ajoute des résidus glutamates (aussi bien sur l' $\alpha$ - que la  $\beta$ -tubuline, mais des chaînes longues sont plus spécifiquement ajoutées sur l'isoforme  $\alpha$ ). C'est aussi le cas du complexe  $\gamma$ -TuRC qui ne semble être actif qu'au centrosome et en quelques autres sites (associés au golgi par exemple) alors qu'il est présent dans tout le cytoplasme en grande quantité (Moudjou et al., 1996). La modification responsable de son activation n'est pas connue et il n'est pas exclu que le complexe ait une autre fonction sous sa forme soluble (pour une revue voir Oakley, 2000b). Enfin, si l'on considère la quantité de 'scaffolding protéins' localisées au centrosome et le nombre d'activités enzymatique qu'elles y concentrent, on peut formuler l'hypothèse souvent avancée mais jamais démontrée de l'existence de protéines qui seraient dirigées vers le centrosome pour y être modifiées (phosphorylées, déphosphorylées, ubiquitinées) avec une cinétique particulière, faisant du centrosome une étape dans des voies de signalisation.

### Protéines transitoirement localisées au centrosome

L'hypothèse avancée ci-dessus pourrait s'appliquer en particulier à des protéines qu'on ne voit s'accumuler que transitoirement au centrosome, par exemple au cours d'une étape d'une voie de différenciation ou d'une phase du cycle de division cellulaire (comme les protéines de la famille des kinases de type polo).

En fait, la plupart des protéines qui se localisent transitoirement au centrosome sont des protéines qui changent de localisation aux transitions entre l'interphase et la mitose. En effet, le centrosome interphasique devient en mitose le pôle du fuseau et ses attributs se modifient. Ces modifications portent entre autre sur les protéines liées à l'organisation des microtubules : de la  $\gamma$ -tubuline est recrutée (Khodjakov and Rieder, 1999), la ninéine est dispersée (Bouckson-Castaing et al., 1996) et d'autres protéines d'ancrage sont accumulées, comme NuMA (Merdes et al., 1996). Dans la drosophile, la protéine Cnn est recrutée, reflétant un contrôle différent de la nucléation en interphase et en mitose (si cnn est mutée, la nucléation interphasique n'est pas modifiée, mais il n'y a plus de microtubules astraux en mitose, Vaizel-Ohayon and Schejter, 1999). Un grand nombre de protéines régulatrices sont recrutées aux pôles pendant la mitose (les kinases de type polo, le complexe APC, etc...). Cependant, même si une partie de leurs fonctions sont connues, le rôle de leur localisation au pôle n'est pas bien évalué en général (activation ? point stratégique où convergent les microtubules kinétochoriens et les microtubules corticaux?). On sait que les protéines du contrôle de sortie de mitose, qui sont importante pour réguler la transition entre la métaphase et l'anaphase en fonction de l'alignement des chromosomes, sont dégradées aux pôles (Mad2, Howell et al., 2000). Il faut noter à cette occasion que des pôles acentriolaires ou des asters acentriolaires obtenus de diverses manières, contiennent une bonne partie des protéines des pôles complets. On ne peut pas juger cependant du fonctionnement de ces protéines dans ce contexte. Certaines protéines sont au contraire spécifiquement liées à la présence d'un centrosome. Un

bon système pour comparer les pôles des fuseaux et les centrosomes mitotique est celui fourni par les mutants de drosophile dont les centrosomes ont tendance à se détacher des pôles (Gonzalez et al., 1990).

### **- Protéines classées suivant leur fonction**

Un certain nombre de propriétés du centrosome peuvent être attribuées directement à des protéines ou des sous-complexes qui lui sont associés. De ce fait, les fonctions du centrosome en tant qu'organite complexe sont souvent confondues avec les propriétés dues à certaines de ses sous-unités protéiques qui peuvent fonctionner isolément. Par exemple, de la possibilité d'assembler des fuseaux acentrosomaux, il est souvent déduit que les centrosomes n'ont pas de rôle dans la formation du fuseau, alors que cela signifie seulement que le rôle du centrosome dans la formation du fuseau est assuré par des sous-unités qui peuvent fonctionner indépendamment. Cela signifie aussi que la fonction de l'organite-centrosome en mitose, qui est liée à sa capacité d'assembler un pôle grâce à ces sous-unités qu'il contient et dont c'est la fonction, doit être cherchée ailleurs que dans l'assemblage du pôle.

#### *Protéines structurales*

On peut considérer comme structurales des protéines dont l'absence entraîne un désassemblage partiel ou total du centrosome, ce qui n'exclut pas qu'elles aient d'autres fonctions. C'est le cas des tubulines qui constituent les microtubules des centrioles ou des grandes protéines à domaine coiled-coil de la matrice. Les tektines, par analogie à leur rôle dans les axonèmes pourraient aussi avoir un rôle dans la stabilité des centrioles, mais cela n'a jamais été démontré (Larsson et al., 2000; Steffen et al., 1994; Steffen and Linck, 1988). Enfin, il doit exister des protéines qui stabilisent les bouts des microtubules centriolaires. C-Nap1 et la ninéine sont de bons candidats (Mayor et al., 2000 ; Mogensen et al., 2000). Il est

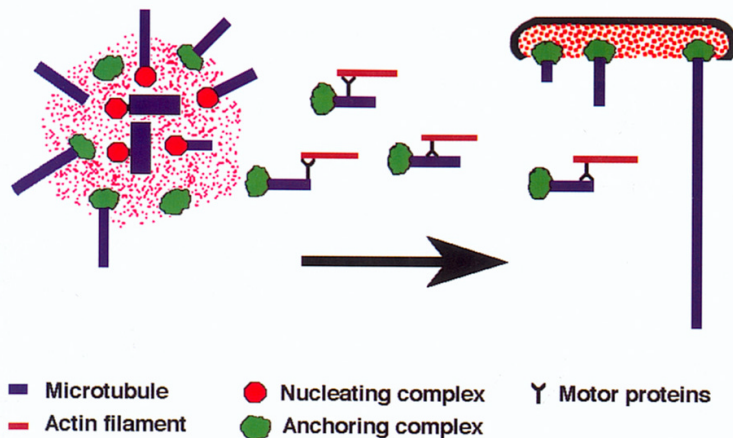
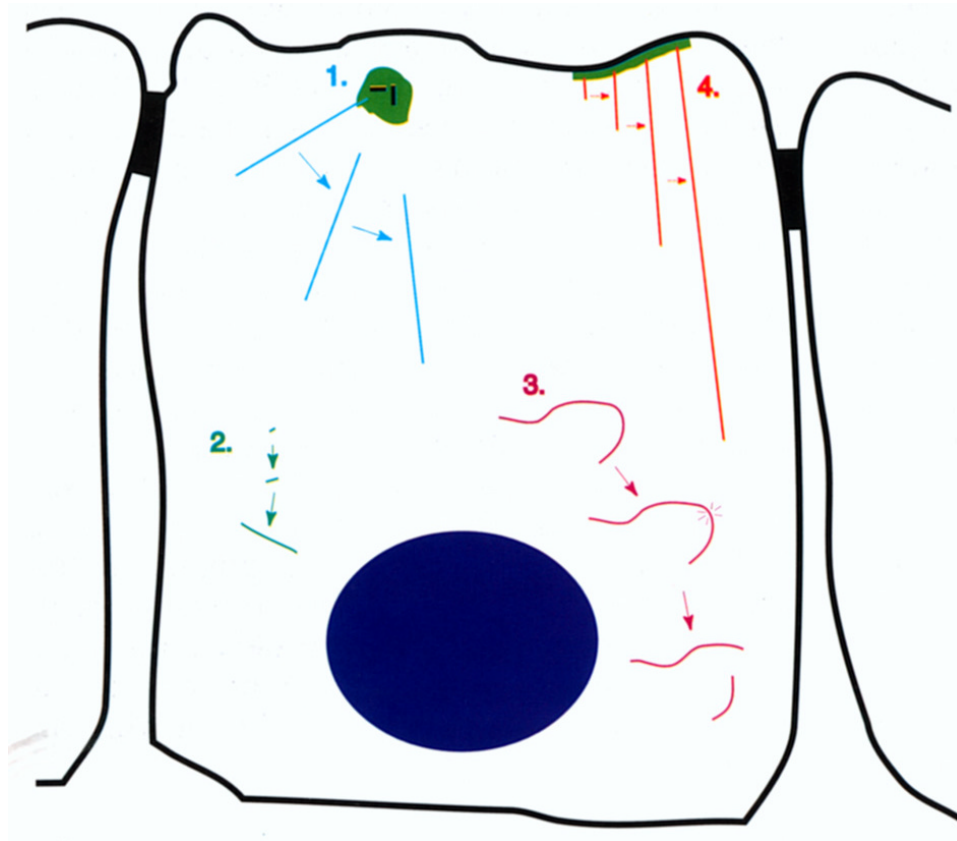
intéressant de noter que l'activité de C-Nap1 est régulée par une kinase (Nek2) et que cette régulation est essentielle à la stabilité des centrioles (Uto and Sagata, 2000). Il semble donc que la cellule dispose là d'un moyen assez direct de désassembler son centrosome (en inhibant Nek2).

### Scaffolding proteins

Le concept de scaffolding protein est bien connu dans les voies de signalisation (réponse au stress, aux agents mitogènes, etc.). Ces protéines mettent en contact plusieurs protéines, et peuvent assurer la spécificité de l'action d'une enzyme sur son substrat. Elles ont aussi souvent un rôle de localisation de l'activité d'une enzyme (pour des revues récentes voir, Burack and Shaw, 2000; Garrington and Johnson, 1999). L'AKAP 450, qui peut lier la protéine kinase A ainsi que d'autres enzymes et semble régulée par la calmoduline, est un parfait exemple de ce type de protéine (pour des revues sur le rôle des AKAP – A kinase anchoring protein – voir, Diviani and Scott, 2001; Feliciello et al., 2001), bien qu'on ne comprenne pas le rôle de la localisation centrosomienne de ces activités (intégration de plusieurs voies de signalisation, ou simple régulation de l'activité de nucléation du centrosome ou de sa duplication par ces voies de signalisation). On peut aussi placer parmi ces protéines la péricentrine.

### Nucléation des microtubules

Les protéines du complexe  $\gamma$ -TuRC font partie de ce groupe, mais il semble qu'il faille en inclure d'autres, qui peut-être piègeraient des dimères d' $\alpha/\beta$ -tubuline (Meda et al., 1997), ou qui joueraient sur les paramètres de la dynamique des microtubules (Lee et al., 2001).



### Figure 31 : Régulation du réseau microtubulaire

Le schéma du haut, tiré de Keating et Borisy (*The Centrosome*, 1999), illustre les différentes origines des microtubules dans une cellule : le microtubule 1 est nucléé puis relâché par le centrosome, le microtubule 2 est nucléé spontanément dans le cytoplasme, le microtubule 3 est un microtubule stable qui a pu être relâché par le centrosome et qui en se brisant donne deux microtubules, ce qui peut mener à sa dépolymérisation s'il était stabilisé par des complexes associés à ses bouts. Le microtubule 4 est ancré par son bout moins dans la membrane plasmique. Mais il n'a pas forcément été nucléé là, comme l'illustre le schéma du bas, tiré de Mogensen (*The Centrosome*, 1999), qui propose un modèle de transport des microtubules nucléés au centrosome vers des sites d'ancrage (à la membrane plasmique par exemple).

### Organisation des microtubules

L'organisation des microtubules au niveau du centrosome peut être attribuée à trois classes de protéines : les protéines d'ancrage (la ninéine) ou de stabilisation des bouts moins (le complexe  $\gamma$ -TuRC), les protéines capables de couper les microtubules, qui peuvent réguler leur détachement du centrosome (la katanine) et les moteurs moléculaires, en particulier la dynéine (Haimo, 1997; Heald et al., 1996; Rodionov and Borisy, 1997; Vorobjev et al., 2001; Wilde and Zheng, 1999) et son complexe d'ancrage et de régulation, la dynactine (Quintyne et al., 1999), sans oublier les kinésines, qui ont un rôle important en mitose (Xklp2, Boleti et al., 1996 ; Eg5, Blangy et al., 1995).

Ces protéines à elles seules suffisent-elles à rendre compte des capacités d'organisation des microtubules attribuées au centrosome ? Par exemple, des moteurs de type dynéine peuvent à eux seuls assembler un aster qui pourra ensuite être stabilisé par des protéines d'ancrage. De même en mitose, on peut attribuer à des moteurs et à des protéines d'ancrage les propriétés nécessaires à l'assemblage des pôles (Merdes et al., 2000; Merdes et al., 1996; Zimmerman and Doxsey, 2000). Il n'est pas possible aujourd'hui d'estimer la différence fonctionnelle qui peut exister entre de tels assemblages acentriolaires et un aster organisé par un centrosome. Néanmoins, la capacité à se dupliquer fait évidemment défaut aux assemblages acentriolaires, et les propriétés mécaniques de ces deux types d'asters (résistance à la traction par exemple) sont sûrement différentes. La différence la plus frappante apparaîtra sans doute lorsque l'on sera capable d'aborder expérimentalement la possibilité de réponses actives du centrosome (ancrer ou relâcher plus de microtubules du côté où ça tire le plus par exemple). On peut s'attendre à l'existence de telles réponses vu la taille et la complexité de cet organite qui a presque les dimensions d'une bactérie.



### Régulation de la duplication

Comme on l'a vu plus haut, la duplication du centrosome au cours du cycle de division cellulaire est soigneusement contrôlée. Ce contrôle passe par l'activité de la kinase cdk2 et donc par le niveau d'expression de la cycline E ou de la cycline A selon les systèmes. La cycline E a été localisée au centrosome (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Meraldi et al., 1999; Okuda et al., 2000). Cdk2 assure la stabilité de la kinase Mps1, toujours localisée au centrosome (Fisk and Winey, 2001). La protéine centriolaire centrine 3, de type calmoduline, est aussi probablement impliquée dans le processus de duplication, ce qui pourrait suggérer une régulation par des signaux calciques (Baum et al., 1986 ; Middendorp et al., 2000).

### Cycle de division cellulaire

De nombreuses protéines qui ont un rôle important pour le bon déroulement du cycle cellulaire sont localisées au centrosome, soit transitoirement (comme les kinases de type Polo ou de type Aurora, pour une revue voir Goepfert and Brinkley, 2000 ; le complexe APC/cyclosome, pour une revue voir, Cerutti and Simanis, 2000 ; la kinase mitotique cdk1, pour une revue voir Ohi and Gould, 1999 ; les protéines de checkpoint p21 et p53, pour une revue voir Winey, 1996 ; et bien d'autres le plus souvent accumulées au pôle en mitose), soit tout au cours du cycle (Suc1, Riabowol et al., 1989). La question qui se pose alors est de savoir si ces protéines sont là pour réguler l'activité du centrosome en fonction des phases du cycle (sa capacité de nucléation et d'ancrage des microtubules, sa duplication), ou bien si cette localisation est importante pour leur activité propre (activation ou inhibition, intégration de signaux, etc...).

### Activités enzymatiques

Un certain nombre d'enzymes impliquées dans divers mécanismes sont concentrées au centrosome : protéines liées à l'apoptose (comme la caspase 3 et la survivine, Li et al., 1999 ; pour une revue, Brinkley, 2001), à la protéolyse. Dans ce dernier cas, on peut illustrer les hésitations dans l'interprétation de la localisation centrosomienne. Le protéasome est dirigé vers le centrosome (Wigley et al., 1999) et il semble y être plus actif (Fabunmi et al., 2000). Mais est-ce parce que les protéasomes actifs sont envoyés au centrosome (pour que les résidus des protéines empruntent les voies de recyclage) ou bien parce que le protéasome est activé au centrosome ? Une autre possibilité est que la localisation de complexes de protéasome actifs soit importante pour la régulation du centrosome lui-même et en particulier de sa duplication (Freed et al., 1999).

On a déjà rappelé la localisation centrosomienne de protéines impliquées dans des voies de transduction (la kinase A régulée par l'AMP cyclique, la kinase de type C, la kinase régulée par le calcium, mais aussi la phosphatase 2A, Sontag et al., 1995 ou la phosphatase PPX, Brewis et al., 1993). La question est toujours la même : régulation de l'activité du centrosome ou importance de la localisation de ces enzymes pour leur fonction ?

En effet, il semble normal que le centrosome soit une des cibles de ces voies de transduction, car les réponses cellulaires impliquent habituellement une modification du cytosquelette et car la duplication du centrosome doit être couplée au cycle de division cellulaire. Mais, par ailleurs, la situation du centrosome au centre d'un aster polarisé de microtubules en fait potentiellement un lieu idéal pour certaines étapes de transduction du signal. Par exemple, comme les molécules signalisatrices arrivent en général en plusieurs points de la périphérie cellulaire, il pourrait être intéressant de 'sommer' le signal en le concentrant au centrosome via les microtubules. Si un certain seuil est atteint, un signal pourra en retour être transmis vers tous les points de la périphérie cellulaire via ces même microtubules.

## - Conclusion

La vision assez claire que l'on pouvait se faire du centrosome d'après son ultrastructure, son mode de reproduction ou ses propriétés d'organisation des microtubules se brouille quelque peu lorsque l'on aborde la question de sa composition. C'est toute l'ambiguïté de la définition d'une protéine centrosomienne et donc de la définition du centrosome lui-même qui se révèle ici : soit on restreint le centrosome au centrioles, soit on est contraint d'appeler centrosomien tout ce qui s'associe au complexe assemblé autour des centrioles, et alors on ne sait plus où fixer la limite puisqu'il n'y a pas de membrane pour nous l'indiquer. En fait, cette continuité entre le centrosome et le reste du cytoplasme, impose de bien distinguer les propriétés du centrosome en tant que région cellulaire aux frontières floues- et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces propriétés – des fonctions du centrosome en tant qu'organite isolable. Néanmoins, la restriction du centrosome aux protéines qui sont co-purifiées avec les centrioles lors de leur purification, si elle a l'avantage de fournir une frontière concrète, a sa part d'arbitraire, car elle ne fait que refléter un certain seuil de cohésion fixé par la technique de purification elle-même (c'est la limite de toute approche de fractionnement cellulaire). C'est cependant la complexité moléculaire du centrosome qui ouvre de nouveaux horizons. Ce qui frappe surtout, c'est la variété des protéines qui se concentrent dans ce volume particulier de la cellule. Elle ne doit cependant pas paraître fantaisiste : si le centrosome est petit à l'échelle d'une cellule ( $1/10^{\text{ième}}$  en diamètre soit  $1/1000^{\text{ième}}$  en volume), il reste gros à l'échelle moléculaire (entre mille et cent fois le diamètre d'une protéine, soit entre un million et cent-mille fois son volume). Sa taille, proche de celle d'une bactérie, laisse imaginer l'existence de nombreux mécanismes et en particulier de réponses actives à divers signaux, aussi bien mécaniques que biochimiques. On peut rappeler ici qu'il n'est pas non plus fantaisiste de considérer que la déformation d'un gel puisse modifier ses capacité d'absorption

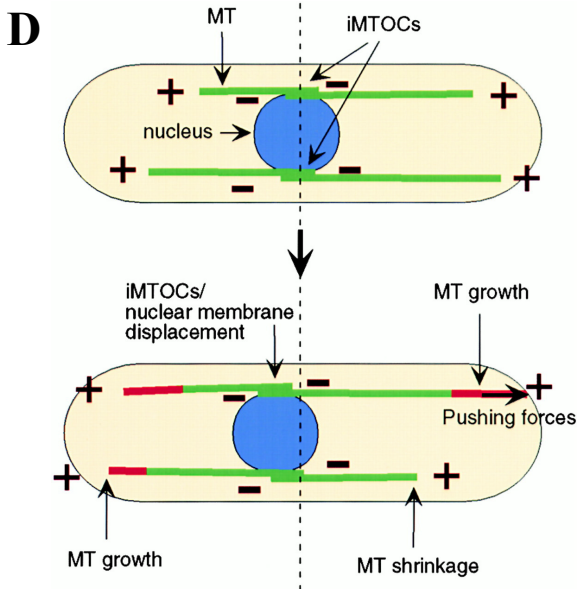
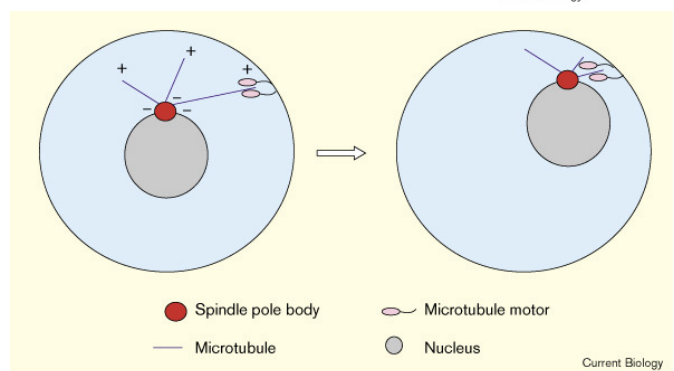
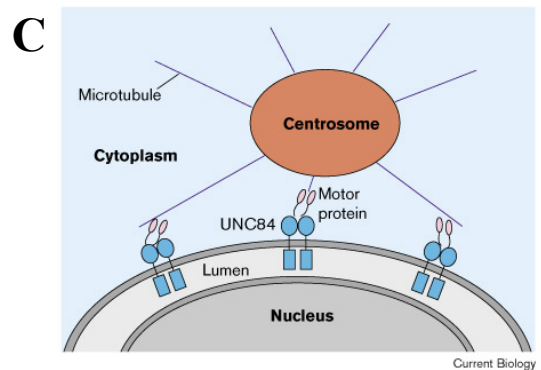
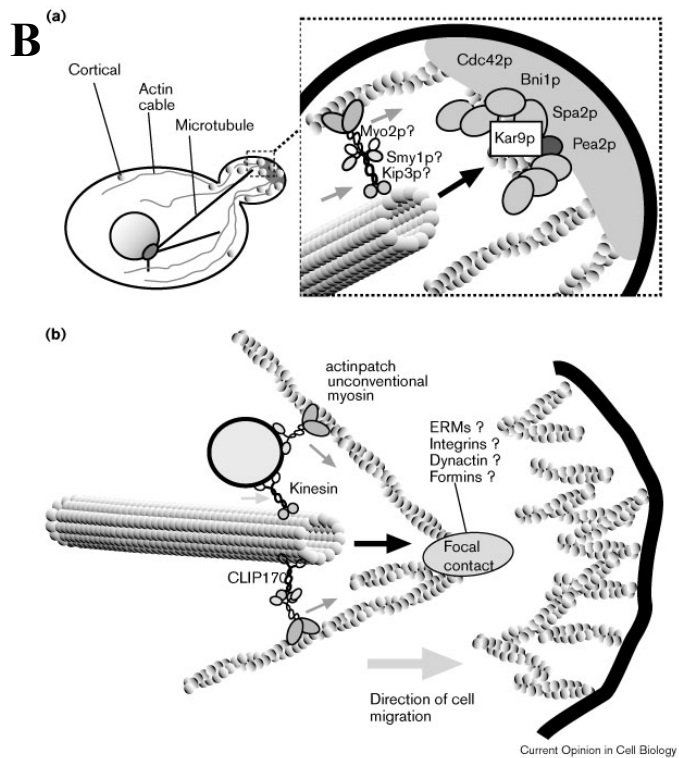
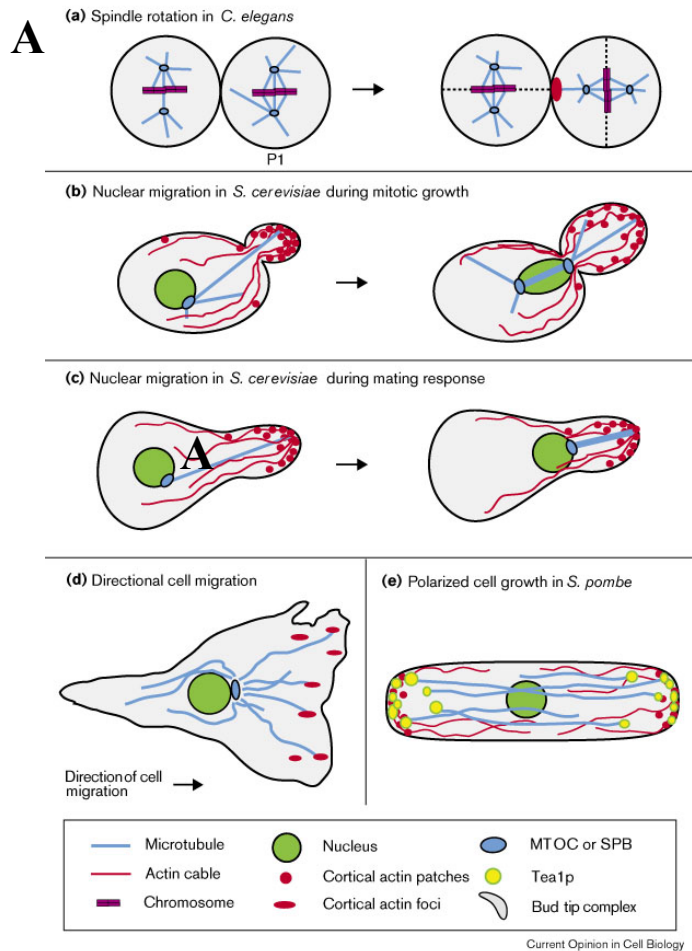
de molécules, en particulier en rendant accessibles des sites d'ancrage, ce qui peut constituer la première étape d'une réponse à un stimulus mécanique. De plus l'absorption de molécules dans un gel, soit dans un milieu confiné, change considérablement leur chimie. Ainsi le centrosome pourrait être le lieu d'une chimie particulière, comportant en particulier des phénomènes de seuils.

## **5. Fonctions plus ou moins avérées**

Notons que certaines expériences mentionnées dans ce chapitre ont été réalisées dans deux systèmes qui ne sont pas des vertébrés - la mouche *D.mélanogaster* et le vers *C.elegans* ( des cuticulates), dont l'épiderme est recouvert d'une cuticule, ce qui les rend très différent des épidermes de vertébré, la mouche ayant même un véritable exosquelette - Cela doit nous rendre prudent dans la généralisation aux vertébrés. En effet, les cuticulates sont des protostomiens, dont le développement est très différent de celui des deutérostomiens. De plus la présence d'un exosquelette révèle une stratégie d'organisation radicalement différente de celle des vertébrés et il ne serait donc pas étonnant qu'elle ait une contrepartie au niveau cellulaire. Nous allons d'abord énoncer quelques mécanismes qui sont le plus souvent avancés pour justifier les fonctions du centrosome puis énumérer ces fonctions.

### **- Mécanismes**

On a déjà évoqué les mécanismes de nucléation, d'ancrage et de relargage des microtubules. Il faut y ajouter les forces produites par des moteurs situés au niveau des centrosomes et qui peuvent maintenir les bout moins (via la dynéine et la dynactine, Quintyne et al., 1999) ou tirer sur un microtubule pour amener son bout moins (encore via les dynéines) ou son bout plus (via les kinésines) au niveau du centrosome. Il ne faut pas non plus oublier les moteurs



**Figure 32 a : Modèles de mécanismes assurant le déplacement du noyau.**

A: La grande variété d'usages (mitose, karyogamie, motilité) et la grande conservation des mécanismes qui déterminent la position du noyau (Goud et Barnes, 2000).

B: Interaction des bouts plus des microtubules avec le cortex cellulaire (ibidem). Récemment, il a été montré que les complexes d'ancrage des bouts plus à la membrane contenaient de la dynéine.

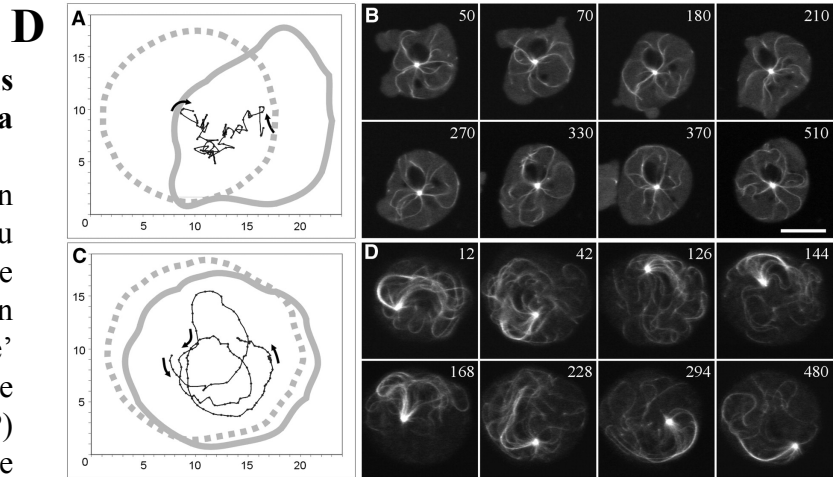
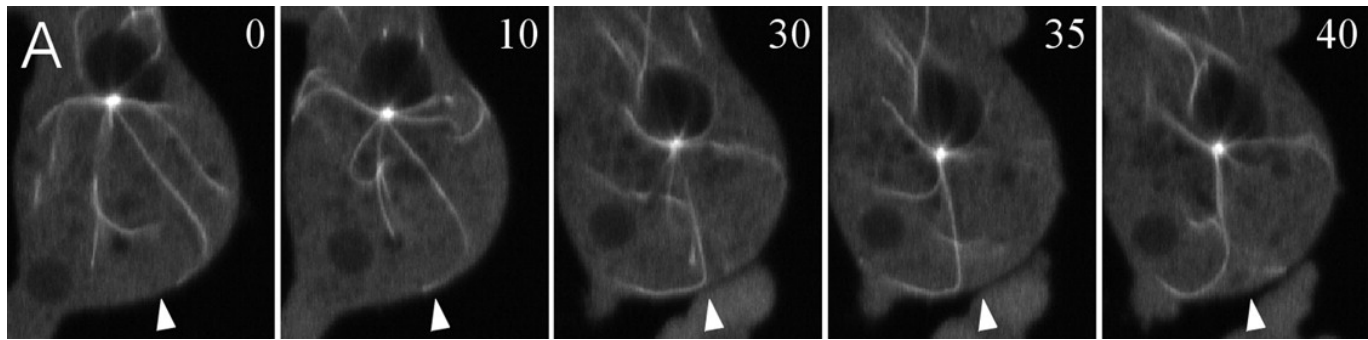
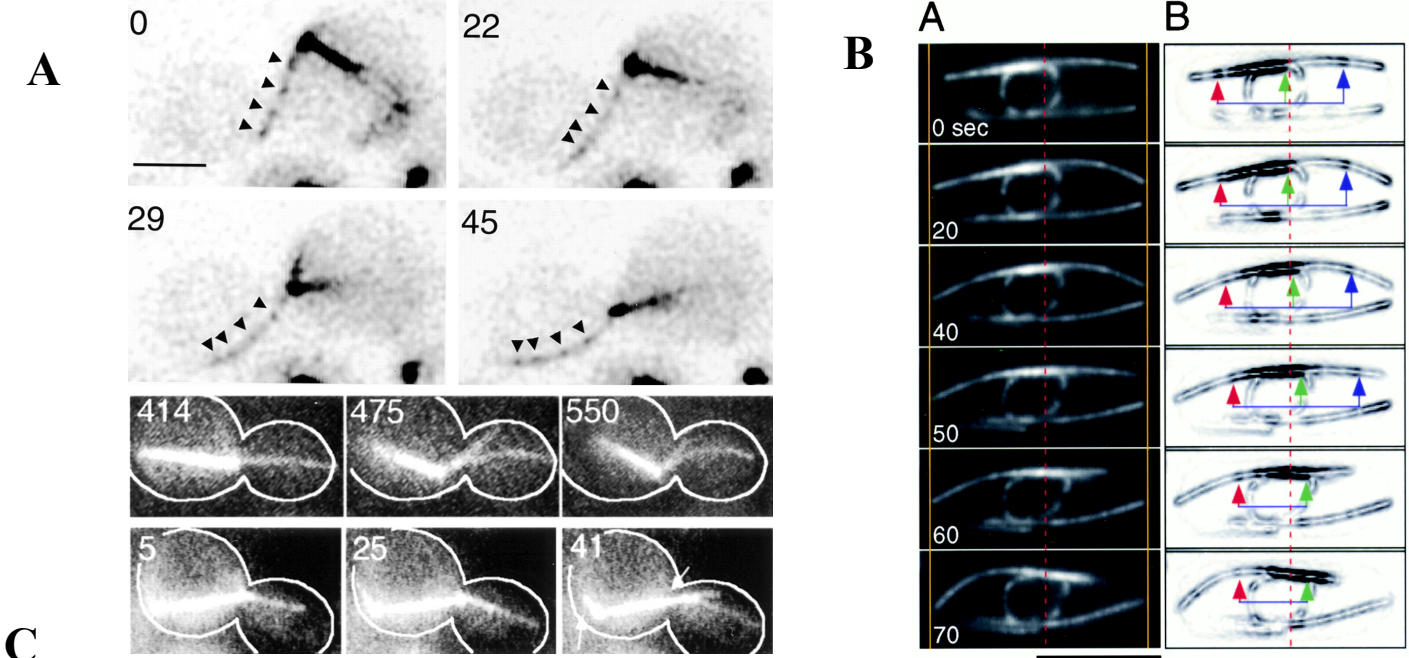
C: Le problème de l'ancrage du noyau au centrosome ou à l'aster de microtubules (Raff, 1999).

D: Dans *S.pombe*, il a été clairement montré qu'au contraire de ce qui semble être très généralement le cas chez les eucaryotes, c'est un mouvement de poussée sur le noyau qui le place au centre de la cellule (Tran et al., 2001).

ancrés à des sites non-centrosomaux, qui capturent les bouts plus des microtubules et peuvent exercer une force de traction sur le centrosome (principalement des dynéines, O'Connell and Wang, 2000). Ces moteurs sont situés sur les membranes et en particulier la membrane plasmique (dynéine et dynactine, Busson et al., 1998) ainsi qu'au niveau des kinétochores en mitose (toujours la dynéine, Banks and Heald, 2001 ; King et al., 2000; Sharp et al., 2000 ; mais aussi des kinésines, McEwen et al., 2001) et sur les chromosomes (des kinésines, Antonio et al., 2000).

Le centrosome est en général associé au noyau ou aux chromosomes, par les microtubules, mais aussi par d'autres fibres (Debec et al., 1999). La preuve en est la co-purification quasiment systématique du noyau et du centrosome, même en l'absence de microtubules (Bornens, 1977). L'analogie avec certains organismes unicellulaires chez qui ces fibres sont particulièrement développées achève de convaincre (Salisbury et al., 1986; Salisbury and Floyd, 1978). Le centrosome peut ainsi transmettre les tractions qui s'exercent sur lui via les microtubules de l'aster et entraîner le noyau ou les chromosomes à sa suite.

Enfin, l'incroyable diversité des activités enzymatiques présentes au centrosome peut avoir des conséquences sur la régulation des mécanismes énoncés ci-dessus (une voie de régulation importante et étonnamment conservée parmi les eucaryotes a été récemment mise à jour et implique la protéine LIS 1, pour une revue voir, Wynshaw-Boris and Gambello, 2001). Il est frappant de constater que les protéines d'ancrage de la dynéine au centrosome, mais aussi dans des complexes membranaires, sont les protéines à grands domaines coiled-coil dont on a parlé à plusieurs reprises et qui recrutent de nombreuses autres activités (les AKAPs, la péricentrine, mais aussi mNudE qui recrute non seulement la chaîne légère de la dynéine, mais aussi la protéine signalisatrice LIS 1 au centrosome, Feng et al., 2000 ; et son équivalent membranaire NUDEL, Sasaki et al., 2000), ce qui laisse imaginer l'existence d'un



**Figure 32 b : Quelques expériences dans des systèmes variés sur le contrôle de la position du noyau**

A : Comportement des microtubule en mitose chez *S.cerevisiae*. Les images du haut montrent un cas où un microtubule court le long de la membrane du bourgeon et tire le noyau. La technique du ‘speckle’ (le microtubule n’est pas marqué de manière homogène par la tubuline GFP) permet de voir que le microtubule lui-même est tiré.

Juste au dessous, on voit un cas où la force est produite par une polymérisation du microtubule qui repousse le noyau, et par une dépolymérisation d’un microtubule ancré qui tire le noyau (Adames et Cooper, 2000).

B : Chez *S.pombe*, la membrane nucléaire a été marquée ainsi que les microtubules, ce qui permet de la voir se déformer sous l’effet de la poussé des microtubules (Tran et al., 2001).

C : Capture d’un microtubule au niveau du cortex cellulaire chez *Dyctyostelium*. On voit très clairement le microtubule être tiré puis relâché (Koonce et al., 1999).

D : Un dominant négatif de la dynéine perturbe la relation entre les microtubules et le cortex (presque aucun microtubule n’est capturé). Le centrosome se met alors à tourner tout autour de la cellule, entraînant le noyau (ibidem).

mécanosenseur au centrosome, élément qui, dans une optique ingénieriale, serait logiquement associé à un mécanisme de positionnement par tractions.

### **- Organisation des microtubules**

Ce que pourrait caractériser un rôle du centrosome dans l'organisation des microtubules n'est pas la formation d'un aster (des moteurs suffisent, Rodionov and Borisy, 1997) ou d'un fuseau (là encore des moteurs pourraient suffire, Kalab et al., 1999; Wilde and Zheng, 1999), mais plutôt une différence qualitative dans la dynamique des asters formés qui pourrait révéler une réponse active du centrosome. Une telle hypothèse a été formulée depuis longtemps et testée *in vitro* en réunissant des centrosomes et des chromosomes et en cherchant à évaluer si un plus grand nombre de microtubules étaient nucléés en direction des chromosomes, mais les résultats ne sont pas très concluants même s'il semble y avoir un faible effet de la chromatine à longue distance (Dogterom et al., 1996; Carazo-Salas et al., 2001). Très peu d'expériences ont été faites en ce sens et c'est encore une question entièrement ouverte. Elle ne répond pas non plus tout à fait à la question d'une réponse active du centrosome, car le biais dans la croissance des microtubules pourrait être lié à un mécanisme associé aux microtubules eux-même (voir les revues récentes d'E. Karsenti sur cette question).

Une fonction complexe du centrosome dans l'organisation des microtubules est la nucléation des axonèmes : c'est le seul cas où des microtubules poussent à partir des microtubules centriolaires. C'est un phénomène très général puisque la plupart des cellules de vertébré possèdent un cil primaire (de nombreuses cellules épithéliales, mais aussi des fibroblastes), quand ce n'est pas un cil modifié (cils sensoriels de l'œil) ou de véritables cils motiles. Dans le cas des cils primaires, le centriole parental sert d'amorce mais continue aussi à ancrer les microtubules cytoplasmiques. C'est donc bien le centrosome tout entier qui se retrouve à la base du cil et non pas seulement le centriole parental transformé en corps basal. Le



mécanisme de nucléation et sa régulation sont parfaitement inconnus (du moins aussi peu connus que ceux des autres axonèmes). A part ces mécanismes de nucléation, il reste aussi à déterminer si le centrosome a un rôle dans la régulation du fonctionnement des structures microtubulaires qui lui sont associées (influer sur le battement du cils ou avoir un rôle dans la transduction des signaux perçus par les cils sensoriels comme les cônes, les bâtonnets ou le kinocilium des cellules de l'oreille interne).

### **- Position du noyau/définition du plan de clivage**

Parfois en interphase, mais surtout en mitose, il est important pour la cellule de déplacer son noyau (ou ses chromosomes) par rapport au contour cellulaire. Les exemples sont multiples: position des noyaux dans le syncytium de l'embryon de drosophile, mouvement des pronuclei lors de la fécondation et, bien sûr, position, rotation et asymétrie du fuseau pour définir le plan de clivage, qui est lié à la position des chromosomes (ou du moins à la position des bouts plus des microtubules du fuseau, voir les travaux de Rappaport, Oegema and Mitchison, 1997; Rappaport, 1997 ; mais aussi tous les travaux récents sur le complexe CENP-E/Aurora 2, Adams et al., 2001b; Adams et al., 2000; Wheatley et al., 2001 et pour une revue, Adams et al., 2001a).

Dans toutes ces situations, le système microtubulaire fournit la force motrice grâce aux mécanismes décrits plus haut. Cette force est transmise au noyau ou aux chromosomes par l'intermédiaire du centrosome, qui assure la cohésion de l'aster en interphase et semble nécessaire en mitose à la formation des microtubules dits astraux qui relient le pôle du fuseau au cortex (par exemple, quand la protéine de drosophile *cnn*, qui recrute la  $\gamma$ -tubuline aux pôles du fuseau mitotique et qui semble nécessaire à la présence de microtubules astraux, est mutée, les noyaux s'agrègent dans le syncytium, Megraw et al., 1999). La corrélation entre la présence de centrioles aux pôles d'un fuseau et la présence de microtubules astraux a été

démontrée de multiples façons (Wilson et al., 1997; de Saint Phalle and Sullivan, 1998 ; Khodjakov et al., 2000). En l'absence de centrosome, les microtubules kinétochoriens s'assemblent mais il n'y a pas de microtubules émanant des pôles en direction du cortex. Ce résultat est très intéressant , car il souligne la complexité du pôle mitotique, qui apparaît stratifié : un complexe se charge de l'organisation des microtubules kinétochoriens et un autre, associé aux centrioles, se charge des microtubules dirigés vers le cortex. Il reste encore à comprendre comment le fonctionnement de ces deux complexes est régulé et coordonné. Faut-il appeler centrosome uniquement la partie associée aux centrioles, du fait qu'il y a une cohésion plus faible de la partie kinétochorienne avec les centrioles, si bien quelle peut dans certaines conditions s'en détacher ? Un pôle fonctionnel et complet doit assurément comporter ces deux parties et il est tout à fait justifié de considérer que le centrosome mitotique est le pôle du fuseau (car c'est bien le pôle tout entier qui a une signification fonctionnelle). En revanche, si on considère que le centrosome est un organiste qui , en interphase comme en mitose, a pour fonction d'assembler un aster de microtubule chargé de contrôler la position du noyau (en mitose le noyau serait alors constitué par les chromosomes plus les microtubules kinétochoriens, comme dans les endomitoses, voir la partie phylogénie), il faut bien considérer que le 'corpuscule fusorial' est en fait constitué de deux parties fonctionnelles distinctes : un centrosome et un pôle de fuseau kinétochorien. Dans cette optique, on pourrait imaginer que les protéines qui assurent la cohésion du centrosome et du pôle sont les même que celles qui assurent la cohésion du centrosome et du noyau en interphase (moteurs et microtubules mais aussi fibres contractiles contenant entre autres de la centrine).

Encore une fois, si le centrosome agit comme un simple point de traction sur le noyau, il y a peu de choses à en dire, mais si ce point est capable de mesurer les forces qui s'exercent sur

lui ou de réguler leur intensité pour contrôler sa position, cela devient beaucoup plus intéressant.

Pourquoi suspecter un tel mécanisme ?

Chez la drosophile, il a été montré que plusieurs protéines concentrées au centrosome ont une influence sur le cortex quand le centrosome se trouve à proximité : la protéine Nuf (encore une grande protéine à domaines coiled-coil) est importante lors de la migration des noyaux au cortex du syncytium pour le recrutement d'actine et de membrane pour les pseudo-clivages (Rothwell et al., 1998), la protéine Scrambled est concentrée au centrosome et agit sur le cortex, indépendamment de la présence de microtubules (Stevenson et al., 2001). De même, dans un organisme encore un peu plus éloigné des vertébrés, la levure de boulanger, un mécanisme impliquant la proximité spatiale du centrosome et de la membrane plasmique semble réguler la sortie de mitose. Ainsi la simple proximité spatiale du centrosome et de la membrane plasmique peut constituer un signal. Ce signal pourrait permettre au centrosome de 'savoir' qu'il est arrivé au bon endroit (près de la membrane) et provoquer un changement dans la régulation des forces (afin, dans un cas de se déplacer, ou bien dans un autre cas, de rester où il est).

De plus, des complexes capables de mesurer des tensions existent au niveau des kinétochores. Il est probable que ces complexes existent aussi au niveau de la membrane plasmique et des plaques d'adhésion (Geiger and Bershadsky, 2001) et en général aux points d'ancrage de bout plus de microtubules. Les mécanismes de régulation des bouts plus et de leur interaction avec la membrane plasmique sont très conservés parmi les eucaryotes. La capture et la traction des microtubules par les dynéines semble être elle aussi reposer sur des mécanismes très conservés, impliquant la protéine LIS 1 (voir la revue citée dans le chapitre précédent).

Il est presque certains, même si rien n'a encore été démontré en ce sens, que des mécanismes similaires permettent de mesurer la tension aux bouts moins des microtubules afin de réguler

leur ancrage (les mêmes complexes existent au bout moins, avec la dynéine, LIS 1, mNudE, ancrés sur la péricentrine qui est une protéine à domaines coiled-coil). De plus, il est aisé d'imaginer un mécanisme passant par la déformation des grandes protéines scaffold à domaine coiled-coil du centrosome induisant une modification de leur capacité d'ancrage ou un changement d'activité des protéines qui leur sont associées. Il n'y a malheureusement jusqu'à présent aucun élément expérimental permettant d'étayer ces hypothèses chez les vertébrés, mais de nombreuses pistes moléculaires prometteuses.

### **- Directionnalité de la motilité cellulaire, polarité cellulaire, intégrité cellulaire**

Les mécanismes en jeu dans la motilité cellulaire sont très similaires à ceux qu'on a décrit précédemment pour le contrôle de la position du noyau. En fait il y a une réelle analogie, dans la mesure où, si la paroi cellulaire avance, il faut bien qu'elle tire le noyau (par exemple, une mutation du gène LIS 1 s'accompagne chez l'humain d'un défaut de position du noyau lors de la migration des neurones pendant le développement du système nerveux, les cellules s'allongent, mais les noyaux restent en arrière).

Selon la taille de la cellule, le rôle du système microtubulaire dans le mouvement cellulaire est plus ou moins évident. Chez les amibes *D. discoïdeum*, ou la plupart des petites cellules de vertébré, l'absence de microtubules n'a pas d'effet immédiat sur la motilité, en revanche dans des grandes cellules à déplacement rapide, une destruction des microtubules par des drogues entraîne la perte de morceaux de cytoplasme, des parties motiles s'excisant du corps cellulaire contenant le noyau. On aborde là un point important : l'intégrité de la cellule. Cela ne passe pas forcément, comme on pourrait l'imaginer simplement, par une sorte de force de cohésion exercée par les microtubules (les forces en jeu sont trop grandes pour qu'on puisse imaginer que le système, même ancré au centrosome, résiste), mais plutôt par une 'intégration', dans le sens où il semble qu'en présence d'un système microtubulaire, un pseudopode ne puisse pas

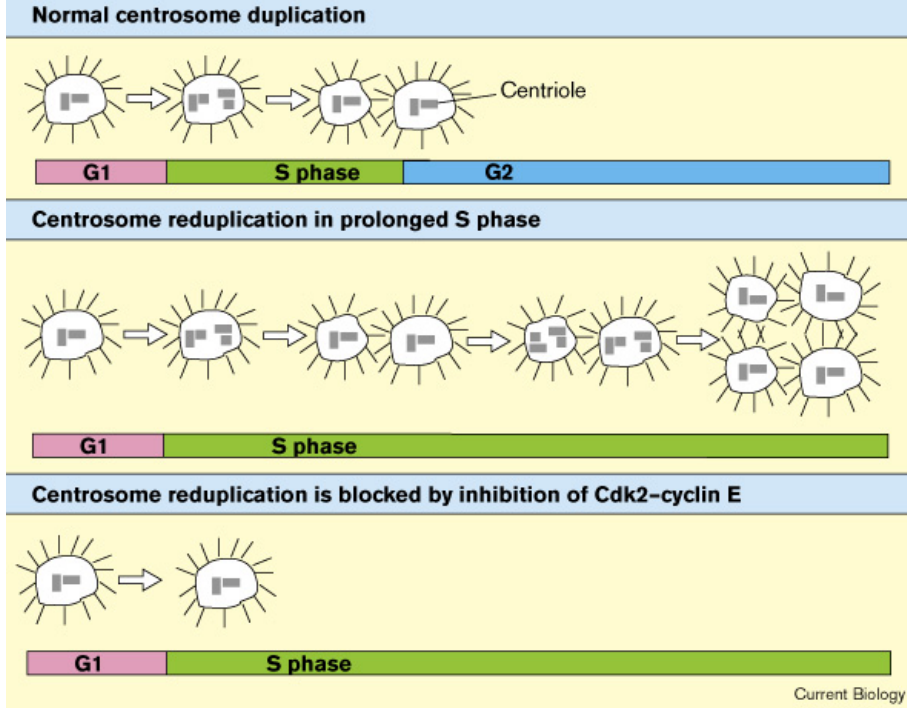
s'éloigner trop du noyau sans être 'arrêté' et surtout dans la mesure où des extensions pseudopodiales ne peuvent pas migrer dans des directions différentes au point de provoquer la dislocation de la cellule.

Il semble que les microtubules régulent la migration de certains types cellulaires, aussi bien au niveau de la contraction à l'arrière de la cellule en migration qu'au niveau de la polymérisation d'actine dans le pseudopode et de l'ancrage de la cellule au support (voir l'introduction du papier 1, le chapitre sur le rôle des microtubules dans la motilité). Mais ce sont là des actions locales, principalement liées à la présence de bouts plus de microtubules, or, si on veut empêcher deux pseudopodes de migrer dans des directions opposées, il faut qu'il y ait une intégration au niveau cellulaire. La fonction du centrosome dans cette forme d'intégration que suppose l'intégrité cellulaire, bien que souvent évoquée (voir la revue de M. Bornens et E. Karsenti, 1984 : 'le centrosome assurerait l'intégrité entre l'appareil moteur et le reste de la cellule', et Malawista and De Boisfleury Chevance, 1982), n'a jamais été évaluée. Attention, il ne faut pas en déduire que suite à une destruction du centrosome, la cellule se disloquerait (ce n'est pas le cas dans les expériences d'ablation réalisées jusqu'ici). Pour mettre en évidence ce rôle d'intégration, il faudrait sûrement imaginer un système expérimental confrontant la cellule à des signaux contradictoires.

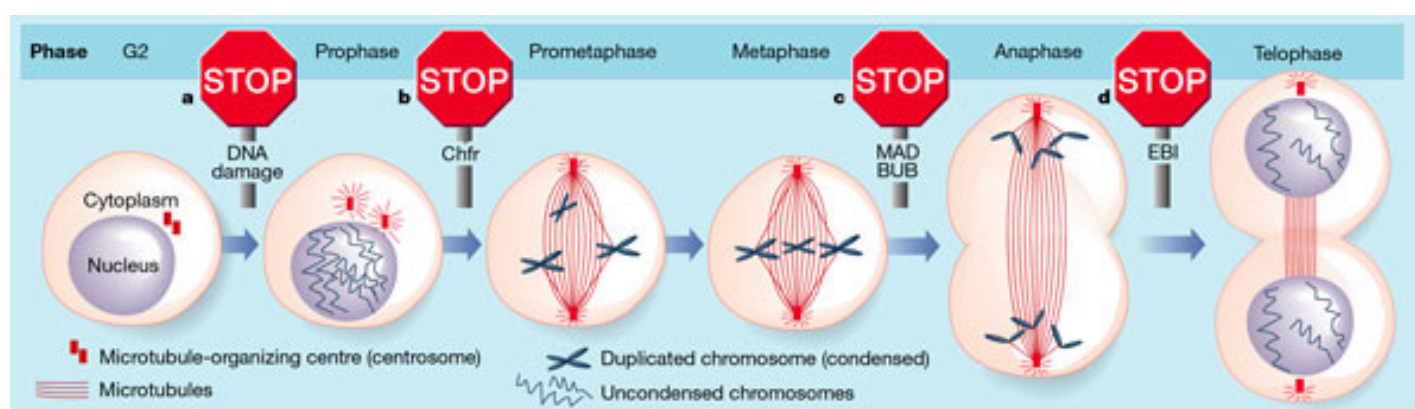
Un autre aspect important de la migration cellulaire et qui concerne aussi bien les petites que les grandes cellules est le tactisme : vers quoi se dirige-t-on ? En général les cellules qui se déplacent ont de multiples tactismes. L'importance des microtubules dans ce phénomène est connue : sans microtubules pas de chimiotactisme chez les amibes (ce n'est pas vrai pour tous les tactismes ni pour tous les systèmes expérimentaux et certains fragments de cellule sans microtubules sont capables de chimiotactisme, Euteneuer and Schliwa, 1984). Le point de départ des spéculations sur l'importance du centrosome dans la motilité dirigée est l'observation de sa position particulière dans la cellule, souvent en avant du noyau par rapport

à la direction de migration. C'est ce qui a amené à suspecter une polarité 'intrinsèque' de la cellule définie par les positions relatives du centrosome et du noyau, et qui pourrait s'aligner sur une polarité extérieure, par capture des microtubules au niveau du cortex par exemple (l'idée est de van Beneden, 1883 et le modèle de recherche et capture est le premier proposé par les découvreurs de l'instabilité dynamique des microtubules, Kirschner and Schulze, 1986). Mais les recherches effectuées dans ce sens n'ont rien apporté de convainquant, et le rôle du centrosome dans la motilité cellulaire, s'il existe, est probablement plus subtil.

Quelles hypothèses formuler ? Une intégration au niveau cellulaire des signaux parvenant à la périphérie est nécessaire pour répondre à un gradient de chimioattractant : le chimioattractant est tout autour de la cellule et il faut détecter le gradient de concentration. La question importante est donc celle du mécanisme qui permet la transduction de ce gradient extérieur en une polarité globale de la cellule permettant une migration dans la direction du gradient. On peut imaginer des mécanismes purement chimiques (avec des seuils adaptables grâce à des boucles de rétroaction amplificatrices rapides et inhibitrices lentes et des récepteurs qui diffusent lentement dans la membrane plasmique), mais il n'est pas évident que ces mécanismes marchent pour toutes les tailles de cellules. Le cytosquelette pourrait participer à la transduction du gradient pour les cellules de grande taille, en permettant de 'relier' différents points de la cellule pour comparer les concentrations. On peut tout à fait envisager une réponse chimiotactique fondée sur un mécanisme de mesure du gradient purement périphérique n'impliquant que le système actine (à partir d'expérience de propulsion de billes par polymérisation d'actine, il a été proposé qu'une brisure de symétrie du système de microfilaments corticaux suffise à expliquer non seulement le mécanisme de propulsion mais aussi la directionnalité du mouvement cellulaire, Cameron et al., 1999; van Oudenaarden and Theriot, 1999; Verkhovsky et al., 1999b ; Noireaux et al., 2000 ; Borisy and Svitkina, 2000). Il est en revanche difficile d'imaginer comment des signaux contradictoires et de nature



<p>Blocage G1 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Absence de centrosome</li> <li>-p53 délocalisée du centrosome</li> </ul>	<p>Désassemblage du centrosome si une cellule rentre en mitose avec un ADN endommagé</p>	<p>Délai d'entrée en mitose en cas de perturbation des microtubules (contrôle de la séparation des centrosomes?)</p>	<p>Destruction de la cycline B au niveau des centrosome.</p> <p>Protéines du MEN (Bub2, <i>S.cerevisiae</i>) et du SIN (Sp1, <i>S.pombe</i>) localisées au centrosome</p>	<p>Interaction pôle/cortex.</p> <p>Bout plus des microtubules</p>	<p>Voir papier 2</p>
↓	↓	↓	↓	↓	↓



**Figure 33 : Le centrosome et le cycle cellulaire**

En haut: Contrôle de la duplication du centrosome par la kinase cdk2-E (figure tirée de Winey, 1999).  
 En bas: les contrôles du cycle cellulaire qui font intervenir le centrosome (à partir de Cortez et Elledge, 2000)

différente pourraient être intégrés de cette manière. Le centrosome serait le lieu idéal de cette intégration (point de convergence des microtubules venant de toutes les régions de la périphérie). Mais encore une fois, il n'y a pas d'expérience qui tente de comprendre le rôle du centrosome dans cette optique. On trouve des études indiquant qu'il ne sert à rien dans la migration non dirigée (A. Khodjakov, communication personnelle), ce qui n'est pas très surprenant puisque dans les cellules utilisées la disparition des microtubules eux-même ne change rien. Il y a un réel problème dans la manière dont a été posée cette question jusqu'à présent, en partie due à cette notion de polarité définie par l'axe centrosome/noyau. Cette polarité ne fait que refléter le rôle de point d'attache (toujours considéré comme passif) que joue le centrosome pour assurer la position du fuseau ou du noyau relativement au cortex, ou pour générer une asymétrie dans l'organisation cellulaire (pour la sécrétion, par exemple dans les synapses lymphatiques, voir la revue *The Lymphocyte Centrosome*, dans *The Centrosome*, 1991). Les notions d'intégrité et d'intégration sont plus subtiles.

### **- Contrôle du cycle cellulaire**

L'horloge du cycle de division cellulaire dirige les étapes de la duplication du centrosome. On a déjà évoqué l'importance de ce contrôle, sa faillite pouvant entraîner une aneuploidie et donc une transformation cancéreuse. On peut donc légitimement se demander s'il existe en retour un contrôle de l'état du centrosome (le nombre de centrosomes, leur avancement dans leur cycle de duplication) sur le cycle cellulaire (Brooks et al., 1980; Maniotis and Schliwa, 1991). En fait, il semble qu'il n'existe pas de contrôle du nombre de centrosomes présents dans une cellule. En effet, des cellules possédant plusieurs centrosomes ne marquent aucun arrêt dans leur cycle de division (Sluder et al., 1997) et celles qui n'en possèdent aucun rentrent souvent en mitose (Hinchcliffe et al., 2001; Khodjakov et al., 2000; Khodjakov and Rieder, 2001). En revanche, la séparation des centrosomes à la fin de la phase de duplication

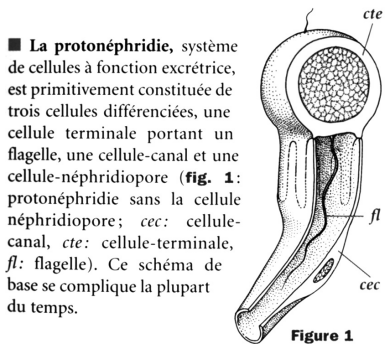
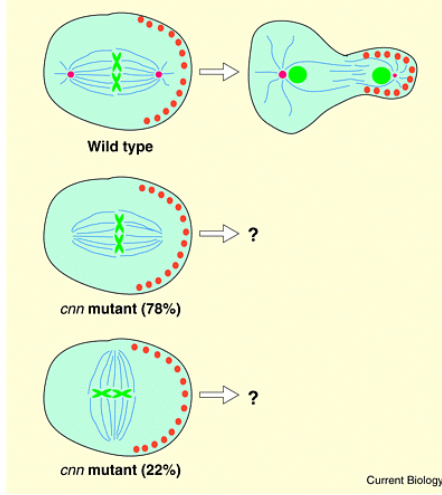
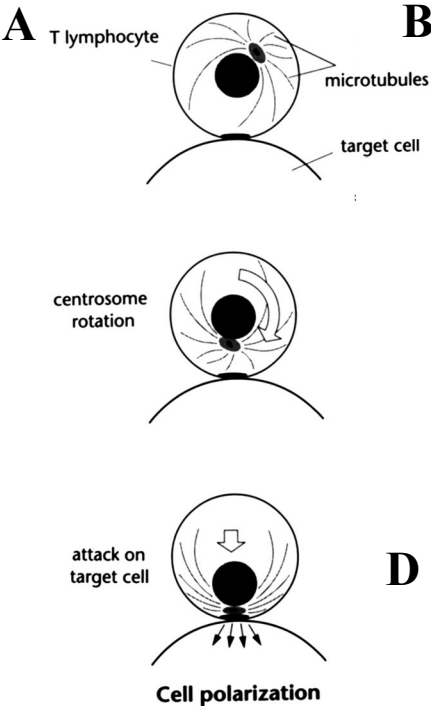


pourrait être l'objet d'un contrôle, impliquant le gène *chfr*, lors de l'entrée en mitose (Cortez and Elledge, 2000; Scolnick and Halazonetis, 2000), mais comme il semble que la plupart des cellules en culture aient perdu ce contrôle, ce qui constitue un des premiers signes de transformation, les expériences d'ablations réalisées jusqu'à présent ne l'ont pas mis en évidence (en revanche, la dépolymérisation des microtubules, qui empêche la séparation des centrosomes, semble entraîner un délai dans l'entrée en mitose, Rieder and Cole, 2000). D'autre part, le centrosome semble jouer un rôle particulier dans les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire en réponse à des lésions dans l'ADN, aussi bien pour l'entrée en mitose (blocage en S/G2 ; Sibon et al., 2000; Smits et al., 2000; Su and Vidwans, 2000; Xu et al., 1999, avec un peu plus que la localisation d'une protéine dans ce cas, car le centrosome est désassemblé si une cellule entre en mitose alors que son ADN a été endommagé, ce qui permet de s'arrêter au checkpoint suivant, le spindle checkpoint), que pour l'entrée en S (blocage en G1 ; Deng and Brodie, 2000; Meek, 2000 ; il s'agit surtout de la localisation de p53). Un contrôle de sortie de mitose qui impliquerait le centrosome (tout au moins en ce qui concerne la localisation de protéines clés) a été décrit chez les deux levures modèle (*S.cerevisiae* et *S.pombe*) et a donné lieu à de multiples revues décrivant la conservation de ces mécanismes parmi les eucaryotes (Balasubramanian et al., 2000; Cerutti and Simanis, 2000; Field et al., 1999; Hales et al., 1999; McCollum and Gould, 2001; Prokopenko et al., 2000; Robinson and Spudich, 2000). Il semble aussi que l'absence de centrosome à la transition M/G1 entraîne un arrêt en G1 (Hinchcliffe et al., 2001; Khodjakov and Rieder, 2001).

## **- Quelques nouvelles pistes : apoptose, dégradation des protéines, confection des antigènes**

Comme dans les situations précédentes, l'implication de la région centrosomienne dans les activités d'apoptose et de protéolyse n'est fondée que sur la localisation de protéines clés dans ces processus. On peut noter que, pour le protéasome, les complexes actifs semblent préférentiellement localisés au centrosome (Fabunmi et al., 2000). La localisation de protéines virales autour du centrosome a pu quant à elle suggérer aussi bien que le centrosome était un lieu de confection des antigènes (Lacaille VG, Androlewicz MJ, ce qui serait logique, vu la la concentration de protéasomes actifs à proximité), ou encore que les mécanismes développés par la cellule pour dégrader des protéines mal repliées avaient pu être détournés par les virus pour monter leur propres petites usines de construction (les agrésomes et les 'usines à virus' qui leur ressemblent sont les uns comme les autres localisés à proximité du centrosome, Heath CM, Windsor M, Wileman T ; Ploubidou A, Moreau V, Ashman K, Reckmann I, Gonzalez C, Way M. ). Il existe aussi quelques allusions au centrosome dans le domaine de l'apoptose, dues à la localisation de la caspase 3 et de la survivine (la caspase 3 est associée au centrosome tout au long du cycle cellulaire et la survivine en mitose)

Encore une fois, c'est sans doute la position stratégique du centrosome, dans la région de convergence des bouts moins des microtubules qui lui vaut la visite de toutes ces protéines (pour les caspases, il est connu qu'une oligomérisation favorise les processus d'autocatalyse, Muzio et al., 1998)– qui en fait un petit réacteur chimique pour la cellule ou un amplificateur de signal. Cependant, il n'est pas exclu que ce ciblage serve à intégrer toutes ces voie biochimiques entre elles (il y a un lien évident entre apoptose, cycle cellulaire, migration, signaux diverses comme les signaux mitogéniques ou l'ancrage dans la matrice extracellulaire).



**D**

La protonéphridie, système de cellules à fonction excrétrice, est primitivement constituée de trois cellules différenciées, une cellule terminale portant un flagelle, une cellule-canal et une cellule-néphridiopore (fig. 1: protonéphridie sans la cellule néphridiopore; *cec*: cellule-canal, *cte*: cellule-terminale, *fl*: flagelle). Ce schéma de base se complique la plupart du temps.

Figure 1

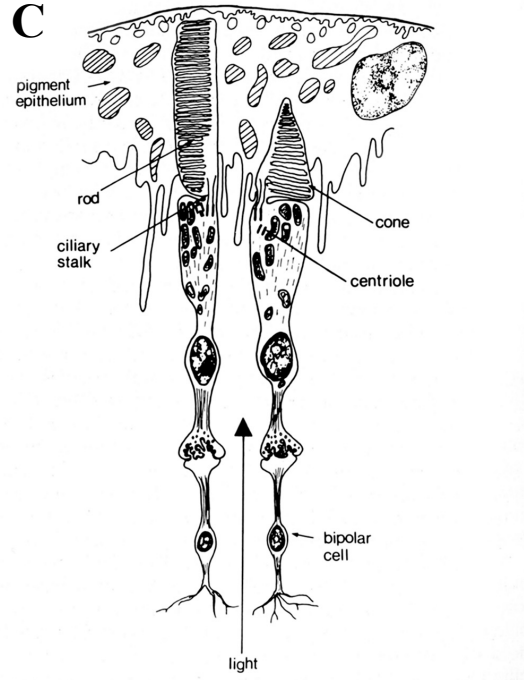
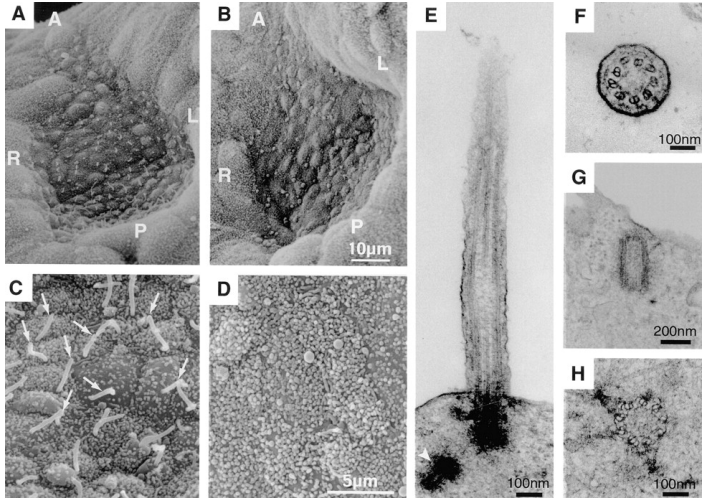


Figure 6.11. Diagram of a retinal rod and a cone. The connection between the cell body and the rod or cone appendage is a primary cilium exhibiting the typical 9 + 0 tubule formula.

**Figure 19-14** Coordinated changes between actin and microtubules in a T lymphocyte. Contact with a target cell causes the cytoskeleton of a cytotoxic T cell to polarize and thereby direct streams of vesicles to the contact site.

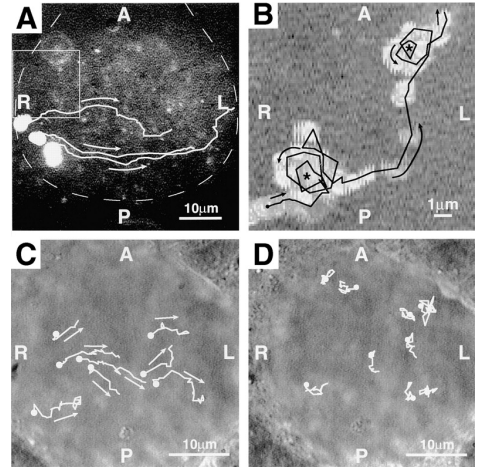
**E**



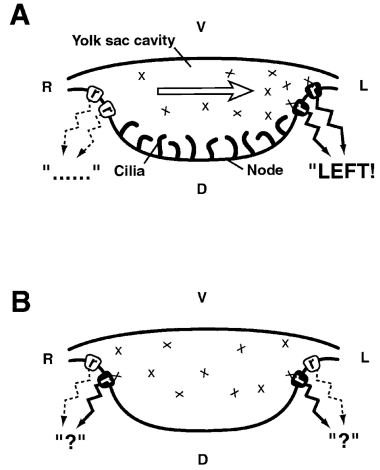
**Figure 34 : Le centrosome dans le développement**

A-D : Quelques exemples de rôles du centrosome dans le développement. A : Dans l'organisme adulte, la polarisation du lymphocyte T dans l'établissement de la synapse lymphatique (à partir de Bray, Cell Movments, 2001). B : Division asymétrique dans le développement du système nerveux de la drosophile. C : Assemblage des cils sensoriels (Wheatley, The Centriole, 1982). D : Les glandes sécrétrices des bilatériens utilisent des flagelles pour propulser le liquide excrété (Lecointre et Leguyader, Classification phylogénétique du vivant, 2001). E-F : Les cils primaires peuvent produire un flux de particules qui est important pour l'établissement de l'axe gauche droite chez la souris. E : microscopie électronique montrant les cils primaires et leur absence chez un mutant (D). F : le mouvement de ces cils crée un flux qui peut entraîner des billes (A-C) de la gauche (R) vers la droite (L), les billes restent immobiles dans la cavité du mutant(D). G : modèle.(Nonaka et al. 1998)

**F**



**G**



## **- Development**

Tout au cours de la vie de l'organisme, les différentes fonctions du centrosome évoquées dans ce qui précède sont susceptibles de jouer un rôle primordial (de nombreux thèmes liés au développement sont abordés dans le livre édité par R. Palazzo et G. Schatten, 'The centrosome in cell replication and early development', 2001).

### *Fécondation et développement précoce*

Dans la plupart des organismes, le centrosome – apporté par le spermatozoïde ou présent dans l'ovocyte – nucléé un aster qui va servir à réunir les deux pronuclei. Il faut noter qu'il y a des exceptions, comme chez la souris : le centrosome du spermatozoïde a complètement régressé au cours de la spermatogenèse et ne comporte plus de centriole ; le centrosome de l'ovocyte a lui aussi été inactivé. Dans ce cas, des asters de microtubules sont nucléés dans le cytoplasme et ancrés autour du pronucleus mâle, ce qui permet la réunion des deux pronuclei et leur positionnement au centre de l'ovocyte. On peut s'interroger sur les avantages de ce mode particulier de fécondation sans centrosome : il se peut qu'aucune polarité particulière ne soit imposée par l'aster nucléé par le pronucleus mâle et qu'il en soit ainsi aussi longtemps qu'aucun centrosome n'est assemblé (il est assemblé après quelques mitoses). En effet, la fécondation est pour beaucoup d'espèces une occasion de définir un premier axe de développement (et même dans la souris, le point d'entrée du spermatozoïde détermine l'axe bilatéral de développement de l'embryon, par dépôt de protéines au site d'entrée dans l'ovocyte, Piotrowska and Zernicka-Goetz, 2001). Quelque soit le facteur utilisé (déterminé lors de l'ovogenèse, par la lumière, la gravité ou le point d'entrée du spermatozoïde), ce premier axe détermine l'orientation du fuseau lors de la première mitose, par l'intermédiaire des microtubules asexés nucléés par les centrosomes situés aux pôles. Lors des mitoses suivantes, les rotations (par exemple lors de la deuxième mitose de l'embryon de *C.elegans*,

l'un des deux fuseaux tourne pour se placer perpendiculairement à l'axe de la première division, Hyman and Karsenti, 1996) et les déplacements du fuseau (la première division, dans l'ovocyte de Tubifex, est asymétrique, Shimizu et al., 1998) sont presque toujours le fait de moteurs associés au cortex dont l'action passe par les microtubules astraux. Le fuseau peut aussi être excentré à cause d'une asymétrie dans la taille des deux asters polaires (Shimizu et al., 1998), mais aussi parfois à cause d'une asymétrie du fuseau lui-même (Kaltshmidt et al., 2000).

Dans la plupart des cas étudiés, tout défaut du centrosome (nombre de centrioles, capacité de nucléation, capacité à se dupliquer) entraîne un échec dès les toutes premières divisions. Il faut noter un cas un peu déroutant par rapport aux expériences classiques qui montrent habituellement qu'un centrosome unicentriolaire conduit après une première division à un fuseau monopolaire : le spermatozoïde humain ne comporte qu'un centriole. Il faudrait donc supposer qu'à un moment ou à un autre, deux cycles de duplication du centrosome se succèdent sans mitose.

Enfin, on peut aussi rappeler que, si un ovocyte d'étoile de mer ne peut pas se développer sans centrosome, il peut effectuer de nombreuses divisions apparemment normales sans noyau pourvu qu'il ait un centrosome (Nagano et al., 1981; Picard et al., 1988). L'expérience classique de parthénogenèse artificielle induite par l'injection d'un centrosome dans un ovocyte de xénope démontre l'importance de cet organite au moment de la fécondation (Picard et al., 1987).

Dans le cas particulier de la drosophile, qui n'est pas un vertébré, les premiers cycles se font sans clivage et il se forme un syncytium contenant des milliers de noyaux placés à la périphérie de la cellule géante et qui vont s'exciser tous en même temps. Les défauts d'organisation des microtubules par les centrosomes (il existe un certain nombre de mutants qui ont des défauts de nucléation ou d'ancrage des microtubules au centrosome ou d'ancrage

du centrosome aux pôles du fuseau) sont toujours létaux (Megraw et al., 1999) et entraînent souvent une stérilité du mâle mutant (le centrosome du spermatozoïde ne fonctionne pas) aussi bien que de la femelle mutante (les centrosomes assemblés au cours des premiers cycles de division le sont à partir de protéines maternelles et ne seront donc pas fonctionnels).

### Développement tardif

Tout au long du développement, l'axe et la symétrie des mitoses continue d'être contrôlé et d'impliquer les microtubules astraux, par exemple dans le développement de l'épithélium (O'Connell and Wang, 2000) ou dans celui du système nerveux (Bellaich et al., 2000). Il est intéressant de noter que dans certains cas l'asymétrie entre les deux pôles que l'on a mentionnée plus haut est exploitée, par exemple pour ségréger différentiellement certaines protéines associées à un pôle particulier.

Le rôle du centrosome le mieux établi lors du développement tardif est son rôle dans la ciliogenèse. Il est impliqué dans la nucléation des cils des épithéliums ciliés, mais aussi dans la nucléation des cils sensoriels et enfin dans la nucléation des cils primaires, dont l'importance dans le développement a récemment été démontrée (Nonaka et al., 1998; Norrander et al., 1998).

Malgré l'importance du centrosome dans les premiers stades du développement l'effet plus tardif de certaines mutations peut être analysé en utilisant des femelles et des mâles hétérozygotes. Ainsi, l'ovocyte et le spermatozoïde produits par les hétérozygotes sont fonctionnels et tant que l'embryon se développe sur les stocks protéiques maternels, le centrosome fonctionne normalement. Dans le cas de mutations de la protéine *cnn* (qui recrute la  $\gamma$ -tubuline au centrosome en mitose, Megraw et al., 2001), un adulte apparemment normal (mais stérile, Megraw and Kaufman, 2000) se développe, malgré un nombre assez important de défauts dans l'axe de division des cellules lors du développement du système nerveux

(25%). On peut envisager un certain nombre d'hypothèses pour comprendre ce résultat étonnant : soit la drosophile possède un système redondant qui lui permet d'orienter les fuseaux en absence de microtubules astraux - ce qui est suggéré par l'existence d'une matrice fusoriale formée par la protéine skeletor (Walker et al. 2000, Scholey et al. 2001), mais cela n'explique pas comment est produite la force qui oriente le fuseau - soit la robustesse du procédé tient à des mécanismes de contrôle, qui par exemple attendent que le fuseau soit bien orienté (il bouge par mouvement brownien) pour déclencher l'anaphase (comme cela existe chez les levures). En effet le centrosome est toujours présent aux pôles du fuseau et pourrait en indiquer la position sans l'aide des microtubules. Cela ne ralentirait pas forcément beaucoup la mitose, puisque les cellules sont petites et qu'une 'bonne' orientation représente peut-être un angle suffisamment large pour être le plus probable. Enfin, on peut imaginer que les marqueurs corticaux ou extra-cellulaires permettent aux cellules de se repositionner correctement après la mitose. L'asymétrie du fuseau et de la division, dans les neuroblastes de drosophile, ne dépend pas de microtubules astraux (Giansanti et al., 2001).

Il semble donc, en tout cas chez la drosophile (qui ne possède aucune cellule ciliée), que les fonctions de nucléation du centrosome en mitose puissent être altérées sans entraver le développement tardif (il existe d'ailleurs une lignée cellulaire embryonnaire de drosophile isolée d'une mutation létale qui n'a pas de centrioles, Debec and Abbadie, 1989; Debec et al., 1995)

Le rôle que pourrait avoir le centrosome dans les nombreux mouvements cellulaires qui accompagnent le développement n'a pas été abordé. Ce serait pourtant un excellent système pour évaluer la fonction du centrosome dans la motilité cellulaire.

#### Organisme adulte (tissus et système immunitaire)

Dans l'organisme adulte, le renouvellement de certains tissus nécessite aussi de contrôler l'axe et la position du fuseau (dans les épithéliums). Et de nombreuses cellules continuent de

se déplacer, en particulier des cellules du système immunitaire et des cellules impliquées dans la réparation des lésions des tissus (comme les fibroblastes). Le rôle du centrosome dans le mouvement des cellules est discuté en détail dans l'introduction au papier 1. Il n'y a aucune preuve définitive d'un rôle quelconque du centrosome dans le contrôle de la motilité cellulaire, mais c'est un thème de recherche qui a été très largement abordé dans les années 70 et 80.

Enfin, le centrosome semble jouer un rôle dans le mécanisme de formation des synapses immunologiques par les lymphocytes T.

### Cancer

Le cancer a sa place dans cette partie en tant qu'anomalie du développement. Il a depuis longtemps été remarqué qu'un défaut dans la duplication des centrosomes pouvait entraîner une aneuploïdie (à partir des expériences de Boveri sur la polyspermie). On peut noter à ce propos que de nombreuses lignées transformées qui contiennent une multitude de centrioles capables d'assembler des asters en interphase assemblent des fuseaux bipolaires, ce qui peut être expliqué par le fait que les mitoses multipolaires produisent des cellules tellement anormales et donc la plupart du temps non viable qu'il y a une forte pression de sélection pour des mécanismes qui permettraient de revenir à une bipolarité. Les cellules cancéreuses évoluant plus vite et accumulant les mutations, c'est tout à fait envisageable (Hinchcliffe and Sluder, 2001). Il suffirait en fait tout simplement d'inactiver tous les centrosomes en mitose (l'équivalent de la mutation *cnn* de la drosophile, qui n'empêche pas la formation d'un fuseau bipolaire, ni l'association des centrosomes aux pôles du fuseau, mais inhibe leur capacité de nucléation, Megraw et al., 2001). Il est aussi intéressant de noter qu'une absence de duplication ou la présence d'un unique centrosome ne mène pas toujours à un fuseau monopolaire (Wilson et al., 1997 ; Khodjakov et al., 2000).



Néanmoins, le plus souvent, la présence d'un nombre excessif de centrosomes peut être attribuée à un échec de la mitose et s'accompagne de polyploïdie. Dans ce cas les centrosomes surnuméraires observés dans les tumeurs ne seraient qu'une conséquence d'un défaut de contrôle du cycle cellulaire : une cellule dont la cytokinèse échoue contient deux centrosomes, mais si elle n'est pas transformée, elle reste bloquée en G1, ou entre en apoptose (Andreassen et al., 2001), en revanche si elle entre dans un nouveau cycle de division, elle contiendra quatre centrosomes à la mitose suivante qui sera donc multipolaire.

Récemment, un certain nombre de publications semblent pourtant confirmer qu'il pourrait y avoir dans certains cas production d'un nombre trop élevé de centrosomes (une véritable surduplication) au cours d'un unique cycle de division, provoquant une mitose multipolaire et une aneuploïdie des cellules filles. En effet, il ne semble pas y avoir de contrôle cellulaire permettant de bloquer la multiplication d'une cellule possédant trop de centrosomes (Sluder et al., 1997).

Tout le débat est de savoir si la présence d'un nombre anormalement élevé de centrosomes dans une tumeur n'est toujours qu'une conséquence de la transformation ou si au contraire, dans certains cas, une surduplication pourrait initier un processus de transformation. L'hypothèse de la surduplication est favorisée dans le cas des transformations consécutives à l'infection par papillomavirus (Duensing et al., 2001; Duensing et al., 2000), elle est plus suspect quand il s'agit de mutations dans le gène suppresseur de tumeur p53, ou dans les gènes p21 et p27, dont les produits sont importants pour le blocage en G1 des cellules qui ont un problème en mitose et en particulier qui échouent dans leur cytokinèse (Andreassen et al., 2001). De nombreuses publications affirment pourtant qu'en modifiant les activité de ces protéines ou en jouant directement sur la cycline E, il est possible de provoquer des duplications surnuméraires dans le temps d'un cycle unique. Les autres candidats sont des protéines liées aux voies de protéolyse, qui pourraient avoir une fonction dans la séparation

des deux centrioles, dont certains pensent que c'est l'évènement qui autorise une nouvelle duplication (Hinchcliffe and Sluder, 2001). Dans cette logique, si on perturbe les protéines impliquées dans la séparation des centrioles, on peut provoquer une nouvelle duplication avant la mitose (normalement le nouveau centriole reste associé au plus ancien jusqu'à la phase G1 qui suit son assemblage). Il est à noter que non seulement l'aneuploïdie, mais aussi l'aneuplasia (défaut d'organisation des tissus) peuvent être corrélées avec un défaut du nombre de centrosomes dans les tumeurs (pour une revue voir, Lingle and Salisbury, 2000).

### **- Conclusion**

On aimerait pouvoir à ce point de la présentation du centrosome tirer une définition plus claire de cet organite et faire le point sur les zones d'ombre qui subsistent.

Le centrosome des vertébrés est donc tout d'abord défini par la présence de deux structures microtubulaires appelées centrioles sur lesquelles repose sa cohésion et sa duplication. Cette cohésion est démontrée par la possibilité d'isoler et de purifier un corpuscule comprenant les deux centrioles. Une cellule en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire contient un centrosome en général associé au noyau comme peuvent l'attester des techniques d'isolement du noyau. Quand une cellule entre dans un cycle de division, le centrosome est dupliqué une fois et une seule, au cours de la phase S. Cette duplication est semi-conservative. Elle est contrôlée par des facteurs propres aux centrioles (chaque centriole nucléé l'assemblage d'un seul nouveau centriole) et des facteurs cytoplasmiques qui couplent la duplication au cycle cellulaire (par la kinase cdk2). Le centrosome contient des complexes de nucléation, d'ancrage et de coupure des microtubules ainsi que des moteurs moléculaires, ce qui en fait un lieu privilégié de l'organisation du système microtubulaire en interphase et en mitose. En effet, chaque centrosome est capable d'organiser un pôle fusorial et dans la plupart des cas, quand au moins un centrosome est présent, le nombre de pôle correspond au nombre de centrosomes. Mis à

part son rôle dans la nucléation des cils et des flagelles, la plupart des fonctions actuellement attribuées au centrosome, en particulier au cours du développement, peuvent se rapporter à celles d'un complexe 'passif' d'ancrage des microtubules (un MTOC) permettant de transmettre les forces exercées sur les microtubules afin de contrôler le déplacement du noyau ou du fuseau dans la cellule. Aucune expérience n'a permis jusqu'à présent d'évaluer une réponse 'active' du centrosome affectant par exemple l'organisation des microtubules en réponse à un signal biochimique ou à des contraintes mécaniques. D'un point de vue biochimique, les propriétés de cet énorme complexe moléculaire desservi par le meilleur système de transport (ou de communication) imaginable à l'échelle cellulaire (l'aster polarisé de microtubules) ne sont pas du tout évaluées. Un premier rôle indépendant de ses capacités d'organisation des microtubules vient d'être mis en évidence : une cellule qui sort de mitose sans centrosome ne dupliquera plus son génome (Hinchcliffe et al., 2001; Khodjakov and Rieder, 2001).

## **6. Méthodes expérimentales et systèmes utilisés le plus couramment**

Il existe deux volumes récents regroupant de nombreux articles techniques concernant le centrosome : *Mitosis and Meiosis* (C.L. Rieder Ed., 1999) et *Centrosomes and Spindle Pole Bodies* ( R.E. Palazzo et T.N. Davis Eds., 2001).

### **- Le centrosome isolé**

L'isolation du centrosome et sa purification en masse devraient permettre idéalement d'identifier tous ses composants. Cela a été réalisé pour le centrosome de levure (Wigge et al., 1998) mais pas pour le centrosome de vertébré. Les centrosomes isolés peuvent aussi servir à

simplifier le système étudié pour isoler certaines fonctions, comme la nucléation des microtubules (leur utilisation la plus fréquente), ou à estimer quantitativement la cohésion des deux centrioles par des techniques mécaniques (travaux en cours d'Annie Rousselet). Le centrosome isolé peut être immergé dans des systèmes reconstitués, acellulaires dont il est possible de faire varier la composition moléculaire, afin d'identifier les protéines impliquées dans divers processus, comme sa duplication (Fisk and Winey, 2001; Freed et al., 1999; Fuller et al., 1995; Klotz et al., 1990; Lacey et al., 1999; Nakayama et al., 2000; Tokuyama et al., 2001; Tournier et al., 1991; Tournier et al., 1989). Enfin, la production de centrosomes isolés permet l'utilisation des techniques biochimiques classiques pour juger de la répartition d'une protéine dans différentes fraction cellulaires (utilisation très courante pour caractériser une nouvelle protéine qui semble se concentrer au centrosome).

On peut se convaincre de la fonctionnalité du complexe isolé par l'expérience de parthénogenèse chez le xénope : un centrosome isolé injecté dans un ovocyte permet un développement parthénogénétique et peut donc remplir les fonctions du centrosome apporté par le spermatozoïde. Cela nous renseigne en fait sur la capacité du complexe injecté à assembler un centrosome fonctionnel dans l'ovocyte. Une partie seulement du centrosome pourrait peut-être remplir cette fonction, mais cette partie n'a pas pu être identifiée. On peut aussi vérifier la capacité à nucléer des microtubules dans de la tubuline purifiée (Tassin et al., 1998).

Le problème de ce système est le doute qu'on peut avoir quand à sa capacité de reproduire les fonctions complexes du centrosome, comme celle qu'il pourrait jouer dans la motilité cellulaire. En effet, le centrosome n'a pas de membrane et dans le contexte de la cellule cela signifie qu'il y a un continuum du centrosome au reste du cytoplasme.

## **- Anticorps**

Les anticorps qui reconnaissent spécifiquement des protéines centrosomiales constituent les principaux outils utilisés jusqu'à aujourd'hui dans l'étude du centrosome de vertébrés, la génétique faisant le plus souvent défaut. Les limitations et les artefacts de cette technique sont bien connus : si on sature une protéine abondante du centrosome avec des anticorps, on risque d'entraver le bon fonctionnement d'autres protéines, et d'attribuer à cette protéine une fonction qu'elle n'a pas. On a aussi déjà souligné à plusieurs reprises la difficulté qui consiste à identifier la fonction d'une protéine au centrosome par des techniques qui vont affecter globalement la protéine, comme l'injection d'anticorps, alors qu'elle n'est souvent que concentrée au centrosome et qu'elle est aussi présente dans toute la cellule. Les techniques génétiques (mutants, surexpression ou annulation par RNAi) ont le même défaut tant qu'on a pas identifié une isoforme de la protéine qui serait spécifique du centrosome.

Des précautions particulières doit en général être prise en ce qui concerne l'estimation de la localisation d'une protéine au centrosome à l'aide d'un anticorps polyclonal : de nombreux sérums pré-immuns comportent des anticorps dirigés contre des protéines centrosomiales, qui peuvent être aspécifiquement enrichis après immunisation (Connolly and Kalnins, 1978). L'origine de cet artefact est en général attribué à la présence de nombreux ciliés, qui contiennent des milliers de centrioles, dans les milieux d'élevage des animaux servant à produire le sérum (en particulier dans la paille).

## **- Ovocytes de xénope et autres ovocytes**

Les ovocytes sont très utilisés pour aborder l'étude de la duplication du centrosome et de son rôle dans la mitose (principalement les ovocytes de xénope pour les vertébrés, mais aussi ceux d'oursin, d'étoile de mer, du nématode *C.elegans*, de criquet). Ce sont des grosses cellules que l'on peut manipuler (en couper des fragments, Sluder and Rieder, 1985b, retirer ou

injecter des noyaux ou des centrosomes, Karsenti et al., 1984a; Karsenti et al., 1984b; Picard et al., 1988, injecter des anticorps, des protéines, des ARNm, Middendorp et al., 2000). Des techniques de microscopie utilisant la capacité à faire tourner le plan de polarisation de la lumière qu'ont les structures microtubulaires organisées, permettent de visualiser les asters et les fuseaux *in vivo* quand les ovocytes sont suffisamment transparents. De plus, les premiers cycles de division sont très rapides, ce qui permet de multiplier les expériences.

La principale limitation vient de la particularité des premiers cycles embryonnaires, qui n'ont pas de phase G1. De nombreux systèmes de contrôle du cycle de division cellulaire (checkpoints) sont aussi absents et il n'y a pas de transcription (il peut y avoir plusieurs cycles de division sans noyau).

#### **- Cellules CHO (Chinese hamster ovary)**

Pour pouvoir étudier la duplication du centrosome, il est intéressant de se placer dans un système dans lequel le cycle est arrêté. On a vu que, dans les ovocytes, la phase S est 'permissive' et qu'un centrosome immergé dans un ovocyte ou un extrait d'ovocyte bloqué dans cette phase se duplique plusieurs fois (Hinchcliffe et al., 1999). Cela n'est pas vrai pour la plupart des cellules somatiques, à l'exception d'une lignée issue d'un ovaire de hamster chinois (CHO pour chinese hamster ovary, Balczon et al., 1995). L'expérience classique consiste à bloquer ces cellules en phase S et à chercher à perturber la duplication des centrosomes par des surexpressions de protéines, des injections d'anticorps ou des drogues (Meraldi et al., 1999). Les limitations de cette technique sont évidentes : les cellules CHO ont, du point de vue de la duplication des centrosomes en S, un comportement atypique qui révèle peut-être un défaut de régulation. De plus, les temps de duplication sont très longs (plus de 24 heures), on peut donc se demander ce qu'il advient de cellules bloquées aussi longtemps en phase S. Cette technique n'est donc pas la meilleure pour étudier les régulations de la

duplication. En revanche, elle est plus adaptée à l'étude de l'assemblage des centrosomes. Cette lignée cellulaire a été employée à de nombreuses occasions, son centrosome est par conséquent très bien caractérisé (Kuriyama and Borisy, 1981a).

#### **- Drosophile, C.elegans, souris**

La mouche *Drosophila melanogaster* et le ver *C.elegans* sont des modèles classiques de développement et on a vu l'importance du centrosome dans ce processus. Leur limitation tient au fait qu'ils appartiennent tous les deux à une branche lointaine de celle des vertébrés, dont un des caractères dérivés propres est l'absence de cils (dans les épithéliums chez *C.elegans*, totale chez la drosophile). La divergence de la structure des centrioles dans ces deux espèces pourrait révéler une évolution différente des fonctions de cet organite liée à un schémas d'organisation très lointain de celui des vertébrés (Debec et al., 1999 ; Fisk and Winey, 2001). La souris est un modèle de développement des vertébrés, mais les premiers cycles se font sans centrosome (Calarco-Gillam et al., 1983). La limitation du système xénope, qui est le plus utilisé pour le développement précoce, est la taille importante des blastomères qui rend difficile la localisation des centrosomes. D'une manière générale, il n'existe pas vraiment d'étude du rôle du centrosome au cours du développement des vertébrés (à part dans quelques systèmes de différenciation in vitro). Il y a beaucoup à attendre de telles études et de la mise en place de systèmes expérimentaux adaptés (animaux transgéniques portant des mutations ou exprimant des protéines centrosomiennes fusionnées à la GFP).

#### **- Recherche d'homologues (levures, ciliés, flagellés)**

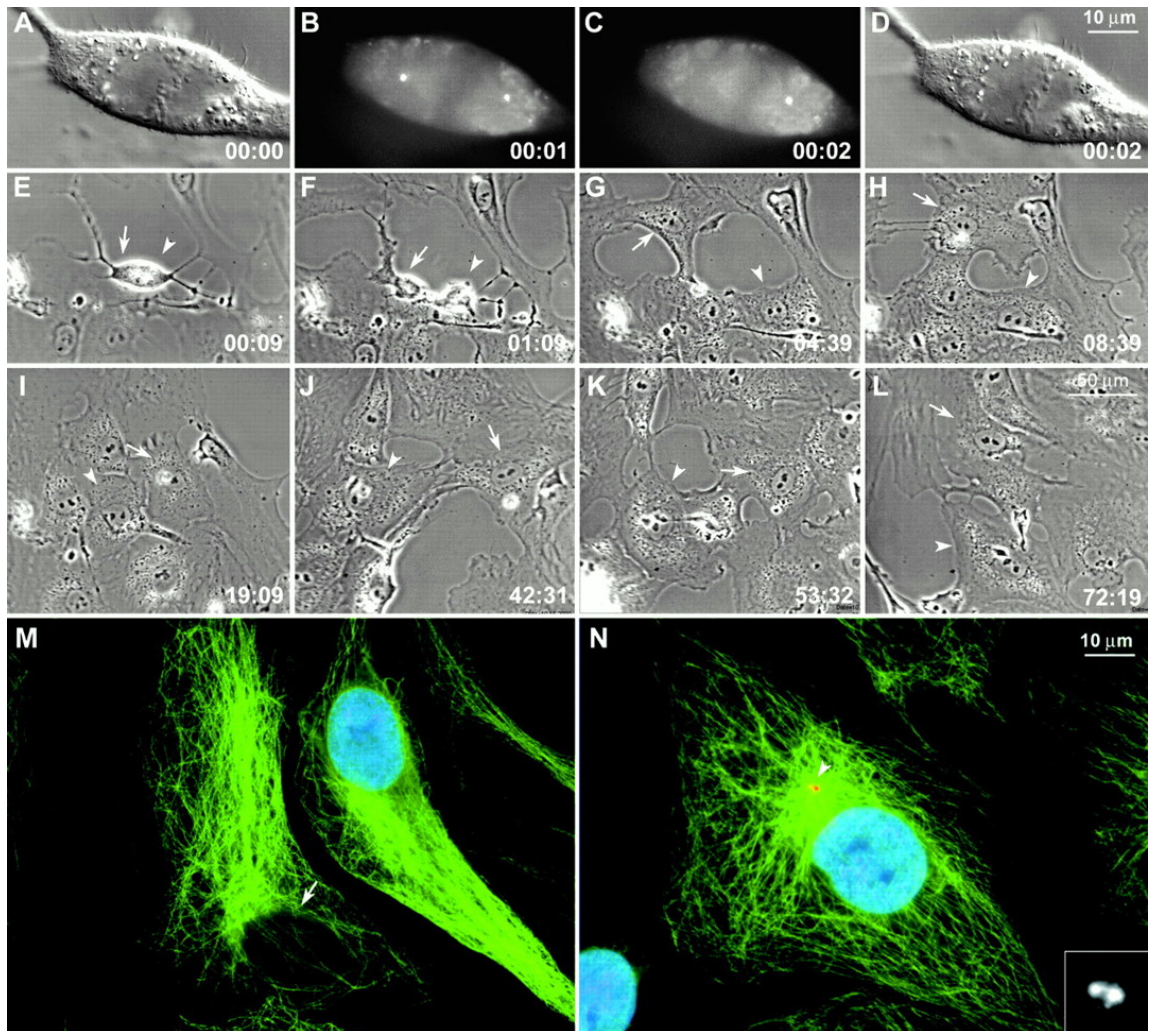
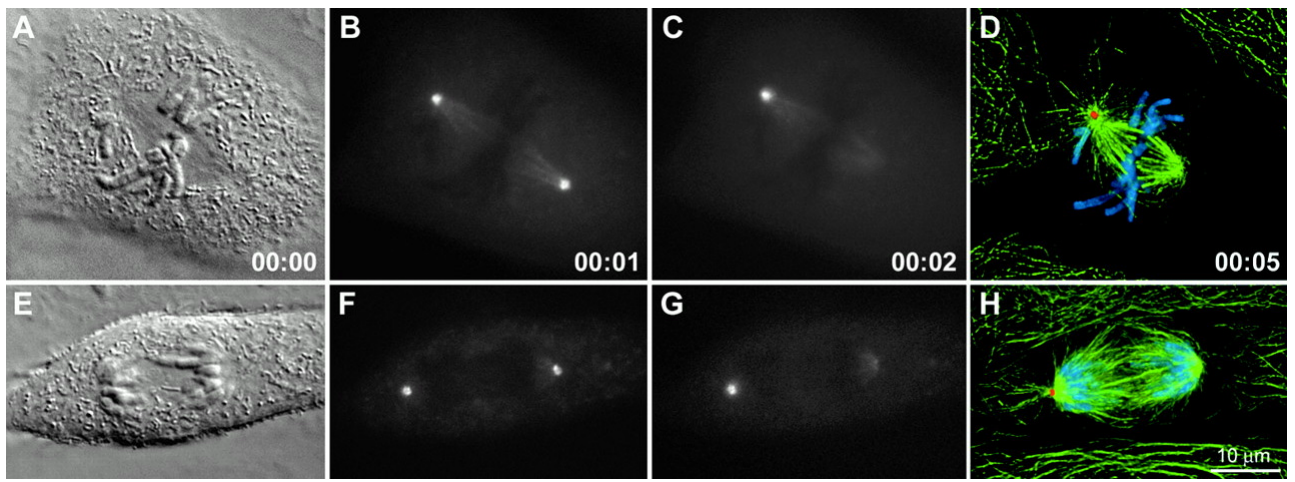
Les protéines de centrosome étant très difficiles à caractériser en raison de leur faible quantité et de leur grande insolubilité, il est très courant d'exploiter les conservation évolutives : dès qu'une protéine est caractérisée dans une espèce, même très éloignée

évolutivement, des homologues potentiels sont immédiatement recherchés chez les vertébrés (Tassin et al., 1997 ; Tassin et al., 1998). C'est surtout le cas pour les levures dont le génome est séquencé et chez qui toutes les protéines centrosomiales sont connues. Certains unicellulaires ciliés ou flagellés pour lesquels existent des cribles génétiques sont aussi féconds en nouvelles protéines centrosomiales (Marshall and Rosenbaum, 2000). Avec le séquençage du génome humain cette pratique devrait se généraliser. La distance évolutive est évidemment le principal obstacle, en particulier en ce qui concerne les levures ou les amibes grégaires (*Dyctyostelium Discoideum*) dont les centrosomes ne comportent pas de centriole (pour une comparaison du NAB de *Dyctyostelium* avec les autres centrosomes voir Graf et al., 2000).

**- Cellules différenciées (polymorphonucléaires, myotubes, ostéoclastes, neurones, cellules épithéliales)**

L'étude du centrosome dans des cellules différenciées permet de le voir à l'œuvre dans des contextes différents et de mieux envisager son rôle. Ainsi les polymorphonucléaires sont de grandes cellules douées de chimiotactisme qui se déplacent rapidement, les myoblastes au contraire, perdent toute motilité quand ils fusionnent pour former des myotubes et leurs centrosomes sont désassemblés. Les ostéoclastes sont aussi produits à partir de la fusion de cellules précurseur (les monocytes), mais ils conservent une grande motilité et gardent tous les centrosomes associés à leurs nombreux noyaux. Ils sont même capable de reformer des monocytes, sans mitose, par excision d'un noyau, accompagné de son centrosome. Ces trois systèmes sont bien caractérisés (Moudjou et al., 1989; Schliwa et al., 1982; Tassin et al., 1985), mais il reste énormément de questions à poser : le comportement du centrosome lors de la réponse chimiotactique des PMN, bien décrit, n'apporte pas vraiment de renseignements sur son rôle dans ce processus. Que se passe t-il au niveau du centrosome lors de la fusion des





### Figure 35 : La microchirurgie laser

Ces figures sont tirées de l'article de Kodjakov et al., 2001. Une technique de microchirurgie désormais parfaitement au point permet à ces chercheurs de détruire spécifiquement une zone délimitée par la fluorescence de la GFP (ici couplée à la  $\gamma$ -tubuline). Dans la série du haut, un pôle du fuseau est détruit, puis la cellule est rapidement fixée et on peut constater que les microtubules astraux ne sont plus présents. Dans l'expérience suivante, un pôle a été détruit puis la cellule a été suivie en vidéomicroscopie. La mitose est apparemment normale. Pourtant, si les cellules sont incubées pendant 72 h avec du BrDU, seule la cellule fille qui contient un centrosome l'incorpore, ce qui prouve que la cellule qui n'a pas de centrosome est restée bloquée en phase G1.

myotubes ou des monocytes? - la fusion des levures lors de la conjugaison implique une repolarisation du système microtubulaire et un rôle du centrosome dans la signalisation liée à cet événement est suspecté - Quel rôle le centrosome joue-t-il dans l'excision de monocytes à partir des ostéoclastes ?

### **- Laser**

On a souligné plusieurs fois la difficulté qu'il y a à caractériser le rôle d'une protéine concentrée au centrosome, et plus généralement à caractériser le rôle du centrosome en tant qu'organite dans des processus cellulaires. Au vu de ses dimensions, la seule technique véritablement adaptée au centrosome pourrait se révéler être le laser, qui permet d'agir spécifiquement, à un moment donné, sur un volume de la taille du centrosome (et même des centrioles). Ainsi, on peut utiliser les techniques de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) pour étudier les caractéristiques du renouvellement d'une protéine au centrosome, ou bien libérer ou au contraire détruire une protéine ou une drogue spécifiquement à proximité du centrosome. Enfin, il est possible de détruire complètement le centrosome grâce à un laser puissant dont la longueur d'onde n'est pas absorbée par la cellule et qui n'est destructif qu'en son point de focalisation (Khodjakov et al., 1997). Des résultats importants ont pu être obtenus par cette technique, mais elle n'a pas encore été appliquée aux nombreux cas décrits plus haut (détruire le centrosome et observer la capacité de la cellule à répondre à un gradient chimique ou à intégrer des signaux contradictoires). Cette technique n'en est qu'à ses débuts et seule l'ablation du centrosome a pour l'instant été pratiquée.

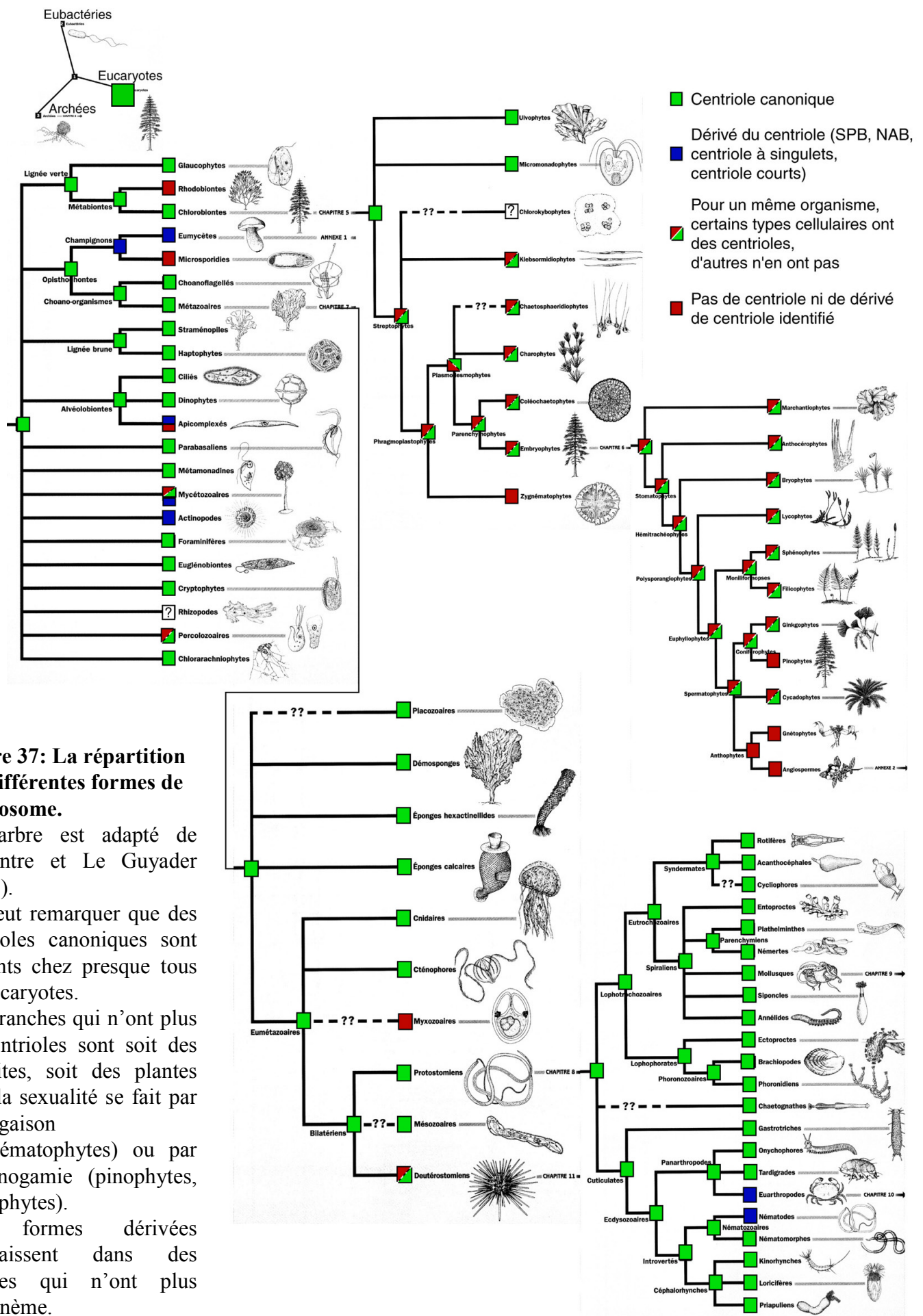
### **- Conclusion sur les lacunes techniques**

On peut dégager de cette partie un certain nombre de conclusions: tout d'abord le manque d'outils spécifiques (ce n'est pas parce qu'on sait qu'une protéine se localise au centrosome et

qu'on peut estimer la fonction de cette protéine au niveau cellulaire qu'on pourra dire quelle est sa fonction au niveau du centrosome) et en particulier d'outils moléculaires, qui sont à l'origine du flou de la définition du centrosome - une définition vague, justifiée par l'échelle peu commune de cet organite à la fois trop gros et trop petit, qui permet la référence à des concepts tout aussi vagues et qui transforme de véritables erreurs de raisonnement en leitmotivs envoûtants. Il y a en fait deux questions qui n'ont jamais été vraiment abordées : les propriétés mécaniques et les caractéristiques biochimiques (quantitatives et résolues dans le temps) du centrosome, *in vitro*, mais surtout *in vivo* (pincettes optiques, déformations de la cellule, imagerie quantitative). Enfin, il faut pouvoir évaluer le rôle du centrosome dans l'intégration de signaux mécaniques et biochimiques et l'existence de réponses actives. Cela signifie l'utilisation de systèmes expérimentaux appropriés que nous essaierons de définir dans les différentes parties de cette thèse.

#### **IV. PHYLOGENIE DU CENTROSOME**

La présence d'un organite assimilable à un centrosome dans des espèces très éloignées évolutivement l'une de l'autre fournit l'occasion de nombreuses comparaisons. Elles se font cependant le plus souvent par la recherche du 'plus petit dénominateur commun' : on parle du centrosome comme s'il était défini de manière universelle, indépendamment de l'espèce considérée, puis on invoque des cas particuliers infirmant les diverses hypothèses formulées sur sa fonction – elles aussi de manière générale -. Avec l'accumulation de cas particuliers, cette démarche ne peut conduire qu'à une confusion grandissante, car le 'plus petit dénominateur commun' finit par se réduire à rien ou presque, ce qui constitue évidemment une contradiction, puisque le centrosome existe et qu'il est remarquablement 'conservé'. La question qui se cache sous cette démarche est en fait celle de la conservation de l'étonnante structure centriolaire, qui suggère une forte contrainte évolutive dont on imagine qu'elle est liée à une fonction essentielle. Mais, comme le centrosome est assimilé aux centrioles dans de nombreux cas, on en arrive à chercher la 'fonction essentielle' du centrosome. Or, le centrosome, en tant que 'corps central' pourrait n'être qu'une manière d'organisation de la cellule (comme dans les fragments de mélanophore dépourvus de centrioles et qui forment un aster centré), qui représente une solution évolutive pour regrouper en un même lieu un certain nombre d'activités. Le fait que ce 'regroupement' se fasse chez les métazoaires autour de la structure centriolaire est à l'origine de nombreuses confusions. A l'approche vaine du 'plus petit dénominateur commun', on peut opposer une approche plus intégrative : si on arrive à caractériser les différences pertinentes qui existent entre deux systèmes expérimentaux ou entre deux types d'organisation cellulaire, on devrait pouvoir résoudre les contradictions apparentes des données expérimentales, pour finalement construire un 'diagramme des



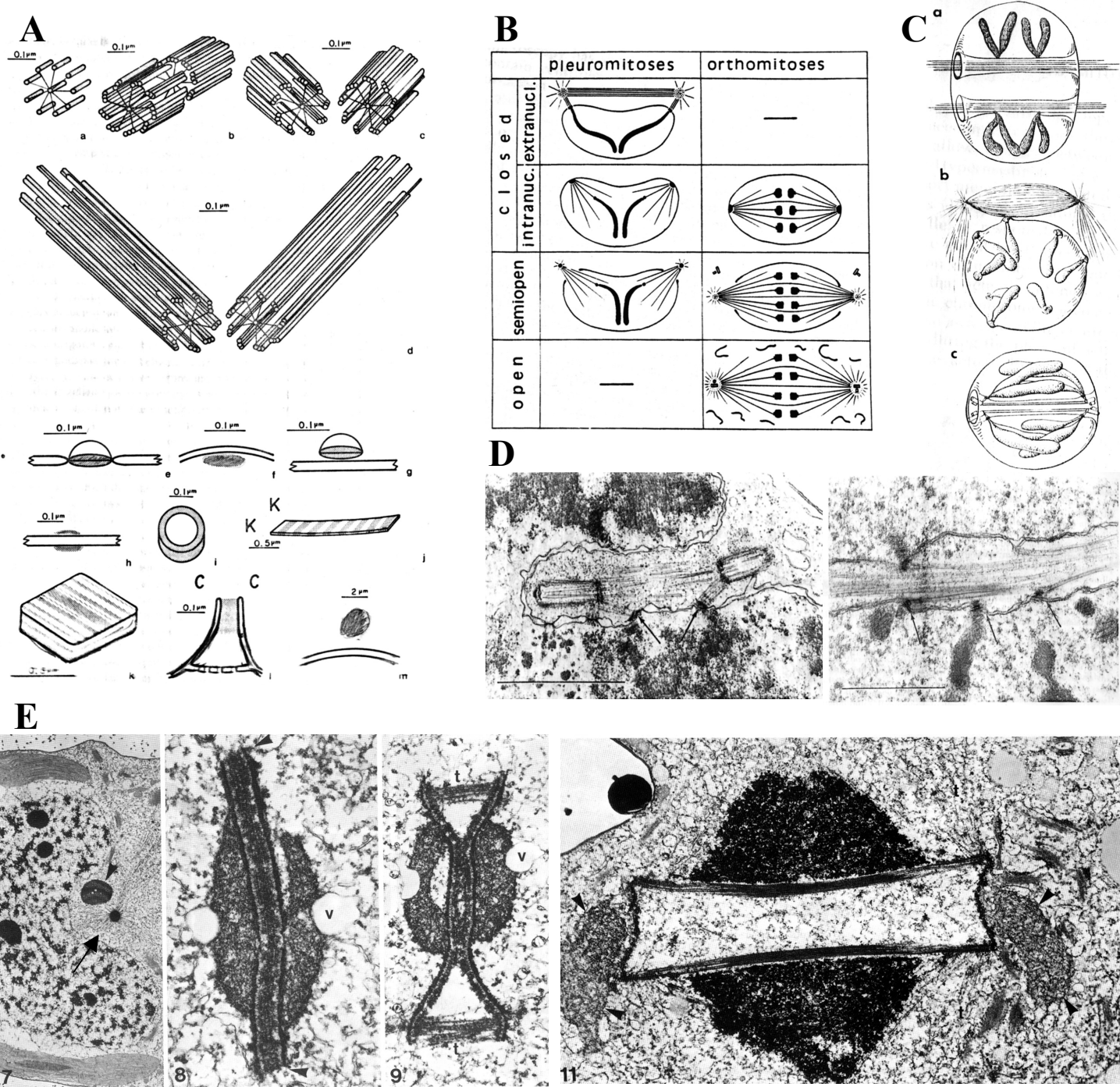
phases' cohérent de l'organisation cellulaire. Autrement dit, il faut considérer la réunion des données concernant le centrosome des différentes espèces et non pas leur intersection.

Dans le cadre de cette thèse, il s'agira d'abord de reposer la question phylogénétique avec précaution, car elle est très délicate, et de suggérer les types d'analyse comparative envisageables. En fait, la précaution se résumera à regrouper les réflexions phylogénétiques dans une partie indépendante. On discutera de spéculations d'une nature particulière : elles peuvent donner des idées d'expériences, mais elles sont en elles-mêmes en général invérifiables. Il existe cependant une sorte de critère de la distance évolutive qui est le test parthénogénétique chez le xénope : on peut, en injectant un centrosome humain ou murin déclencher le développement parthénogénétique de l'ovocyte de xénope, comme le ferait un centrosome de xénope. En revanche, le SPB de levure ou le centrosome de drosophile n'en sont pas capables.

En l'absence de toute revue proposant une lecture phylogénétique du centrosome, je me suis fondé sur des revues portant sur l'évolution de la mitose (Zickler, 1970 ; Kubai, 1975 ; Heath, 1980 ; Raikov, 1994), qui fournissent des indications sur le fuseau mitotique et sur les structures polaires, ainsi que sur un livre d'introduction à l'analyse phylogénétique (Lecointre et Le Guyader, 2001) qui m'a permis d'acquérir les connaissances de base qui me faisaient défaut et qui contient de précieuses indications sur les caractères dérivés propres qui définissent les taxons, dont certaines concernent les centrioles.

## **1. Le centriole : un caractère dérivé propre des eucaryotes**

L'existence dans la plupart des taxons eucaryotes de centrioles constitués de triplets de microtubules, d'une longueur et d'un diamètre identiques à ceux des centrioles trouvés chez les vertébrés, fait du centriole un caractère dérivé propre au même titre que l'axonème, la



### Figure 38: Mitoses et corpuscules polaires

A: Différentes structures de corpuscules polaires. En haut sont représentées les différentes formes de centrioles (a, courts ou avec singulets; alignés comme dans le thymus de veau, b; orthogonaux, c; longs, d). Puis sont représentées un certain nombre de structures acentriolaires (e, plaque insérée dans la membrane plasmique, comme les SPB des levures; f, corpuscule intranucléaire; g, corpuscule extra-nucléaire; g, deux corpuscules; i, un anneau; j, un rhizoplaste, chez certains straménopiles comme *Ochromonas*, les microtubules sont ancrés aux bouts et des centrioles y sont aussi associés; k, une plaque extra-nucléaire, comme chez les diatomés). Tiré de Heath (1980).

B: Différents types de mitose. Les centrioles peuvent être associés aux pôles ou non, ou bien être totalement absents. Tiré de Raikov (1994).

C: Des fuseaux extra-nucléaires dans des endomitoses.

D: Images en microscopie électronique de ce type de mitose. Dans cet exemple, un centriole (à gauche) migrent à travers le noyau dans une invagination de la membrane nucléaire. On peut voir (à droite) les kinétochores transmembranaires ancrés sur des microtubules (flèches). C et D tirés de Kubai (1975).

E: Le centrosome particulier des diatomés. En interphase, une boule ancre les microtubules (flèche). Puis une autre structure est formée (tête de flèche) qui comporte deux plaques. Ces deux plaques se séparent et assemblent un fuseau entre elles sur lequel viendront ensuite s'accrocher les chromosomes. Tiré de Pickett-Heaps et al. (1984).

mitochondrie, les chromosomes, la membrane nucléaire ou encore la sexualité : les organismes qui ne possèdent pas de centriole l'ont perdu secondairement. On peut donc essayer d'étendre la notion de centrosome, qu'on avait fait reposer pour les vertébrés sur la présence de centrioles, à des organites contenant d'autres corpuscules. Ces corpuscules pourraient être des dérivés des centrioles.

#### **- Tentative de définition élargie du centrosome**

Pour établir une définition élargie du centrosome, il faut dégager un certain nombre de critères d'identification. Bon nombre d'espèces eucaryotes possèdent des corpuscules qui ne comportent pas de centrioles et qui pourtant partagent avec le centrosome plusieurs caractéristiques : se sont des particules d'une taille qui varie entre 100 nm et 1 micromètre, reconnaissables à leur structure ordonnée à l'échelle de la dizaine de nanomètres (un motif bien défini au sein de l'espèce et observable en microscopie électronique). Ces particules sont associées aux microtubules et d'un point de vue fonctionnel, à leur nucléation. Elles sont liées au noyau et se dupliquent une fois par cycle de division cellulaire.

Ces critères permettent d'identifier un centrosome chez la plupart des eucaryotes et de ne pas étendre la définition à toutes les particules associées à des microtubules, ce qui permet d'identifier un certain nombre d'eucaryotes ne possédant pas de centrosome. Une définition qui reposerait uniquement sur les capacités d'organisation des microtubules serait insuffisante, car la capacité de nucléer et d'ancrer les microtubules est liée à des complexes moléculaires qui sont souvent associés au centrosome chez les vertébrés, mais qui peuvent aussi s'associer à d'autres structures sur la membrane plasmique, les saccules golgiens ou la membrane nucléaire.



## - Arbre phylogénétique des centrosomes

La figure 37 montre un arbre phylogénétique sur lequel sont indiqués les taxons dans lesquels la structure du centriole a évolué mais qui possèdent encore un centrosome identifiable par les critères définis plus haut, et ceux dans lesquels, selon la même définition, on ne peut plus identifier de centrosome.

Les cas les plus intéressants sont évidemment ceux où une forme dérivée particulière du centriole est retrouvée dans des espèces très éloignées évolutivement et qui ne peuvent pas l'avoir hérité d'un ancêtre commun (ce sont donc des convergences). On peut alors spéculer à loisir sur l'existence ou l'absence de certaines contraintes communes aux deux espèces.

### Les formes dérivées des centrosomes centriolaires:

On peut classer les dérivés du centrosome centriolaire en trois groupes :

- 1) Les centrosomes à centrioles canoniques, mais dont l'organisation est modifiée (par exemple, séparation du complexe d'organisation des microtubules (MTOC) et des centrioles, observée chez certains myxomycètes comme *Physarum polycephalum*, Roobol et al., 1982).
- 2) Les centrosomes à centrioles non-canoniques : taille modifiée (plus longs chez certains ciliés ou dans le spermatozoïde de l'euarthropode *D.melanogaster*, plus courts dans les cellules somatiques de cette mouche, Debec et al., 1999), remplacement des triplets de microtubules par des singulets (chez les apicomplexés comme *Plasmodium falciparum*, et chez le nématode *C.elegans*).
- 2) Les centrosomes acentriolaires : ils contiennent en général des plaques (chez les eumycètes, les straménopiles diatomées, certains myxomycètes comme *D.discoideum*) ou des boules (soit amorphes comme chez les diatomées ou bien qui sont un assemblage de centrioles modifiés, comme chez les actinopodes héliozoaires).

### Les centrioles transitoires

Un certain nombre d'espèces sont capables de produire, au cours de cycles vitaux, soit des cellules flagellées qui possèdent des centrioles canoniques, soit des cellules qui possèdent un dérivé du centriole, soit des cellules sans structure centrosomiale identifiable. Elles font donc de l'assemblage de centrioles *de novo* (*i.e.* sans présence préalable d'un centriole complet, ce qui ne signifie pas que les cellules acentriolaires ne conservent pas un complexe non identifiable d'un point de vue ultrastructurale, qui se dupliquerait et se ségrégerait convenablement à chaque cycle de division cellulaire). Ces espèces sont de deux types : celles dans lesquelles les cellules passent d'une forme flagellée à une forme amiboïde selon leur environnement (plus ou moins liquide par exemple pour les percolozoaires comme *Naegleria*), et les espèces dans lesquelles la forme flagellée correspond à une étape du cycle de reproduction, c'est à dire qui produisent des gamètes ou des spores flagellés (certains myxomycètes et les streptophytes – phylum qui contient les plantes terrestres - dont c'est un caractère dérivé propre, c'est à dire que primitivement elles forment des gamètes flagellées, mais que certaines ont perdu cette caractéristique).

### L'absence de centrosome identifiable

Enfin, dans un certain nombre d'espèces, il est impossible de reconnaître un centrosome et il n'y a jamais assemblage de centriole. C'est le cas des algues rouges (rhodobiontes) ainsi que des zygnématophytes (des algues d'eau douce filamenteuses), des pinophytes et des anthophytes dont font partie les angiospermes (des plantes terrestres dites supérieures).

## - Convergences

### Centrosome et cinétosome

Le cinétosome, ou corps basal, est un centriole associé à un axonème. Il est en général enserré dans un système de fibres très abondantes par rapport à ce qui peut être observé dans les centrosomes classiques. On peut considérer que les cinétosomes sont des centrosomes, à la suite des observations de Henneguy et von Lehnossek, mais aussi parce qu'ils remplissent le 'cahier des charges' du centrosome défini plus haut – on ne peut cependant pas facilement leur donner ce nom dont l'étymologie voudrait qu'il désigne un corpuscule central, alors que les cinétosomes sont en général proches de la membrane plasmique.

Il y a une constante que l'on peut relever tout de suite : la présence d'un cil ou d'un flagelle s'accompagne de la présence d'un centriole canonique. Il peut être long, comme chez certains ciliés et dans le spermatozoïde de drosophile - il est intéressant de noter que dans ce cas, les cils ou les flagelles sont aussi très longs. La correspondance entre longueur de l'axonème et longueur du corps basal est particulièrement frappante chez certains flagellés possédant un rostre conique qui porte des d'axonèmes de taille croissante : la taille de leurs corps basaux augmente avec celle des axonèmes.

Réciproquement, l'absence de cil ou de flagelle s'accompagne souvent d'une modification du centrosome : c'est le cas des eumycètes et des diatomées qui ont des centrosomes à plaques et ne possèdent pas d'axonème. L'exemple des streptophytes, des myxomycètes et des percolozoaires est encore plus frappant : seules les cellules flagellées de ces organismes possèdent des centrioles. Il n'y a pas de forme flagellée pour l'acrasiomycète *Dictyostelium discoideum*, or cette espèce possède un centrosome à plaques contrairement à son cousin (c'est aussi un mycétozoaire, mais c'est en fait un cousin éloigné) le myxomycète *Physarum polycephalum* qui peut assembler des flagelles et possède une paire de centrioles aussi bien dans la forme flagellée que dans la forme amiboïde, dont il se débarrasse quand il vit sous

forme de plasmode. Les parasites obligatoires que sont les microsporidies n'ont pas de centrosome, ni de centriole, ni de flagelle.

La plupart des organismes à cuticule (les cuticulates) – une modification de l'épiderme -ont perdu les cils locomoteurs des cellules de l'épiderme et possèdent des centrioles modifiés. Parmi eux, les euarthropodes, qui ont un véritable squelette externe (exosquelette), n'ont plus aucune cellule ciliée ou flagellée à l'exception des spermatozoïdes dans certains groupes. Or, les cellules de drosophile, un euarthropode, ont des centrioles très courts (100 nm de long) excepté dans le spermatozoïde. Il serait intéressant d'avoir des informations sur les centrioles des euarthropodes qui n'ont pas de spermatozoïde, pour savoir s'ils ont encore plus divergés que ceux de la drosophile, mais je n'ai pas pu trouver de renseignement sur leur centrosome.

On peut s'attendre à ce que la présence d'un exosquelette change complètement la donne au niveau cellulaire, et explique la taille plus petite des cellules ainsi que l'absence de cils. Cette organisation particulière pourrait aussi s'être accompagnée d'une modification de l'organisation intracellulaire et en particulier de la place du centrosome dans cette organisation (l'exosquelette peut former un référentiel externe, lors du développement par exemple, à la manière des parois des cellules de plante). On peut en profiter ici pour faire une analogie un peu dangereuse (due à Michel Bornens), car elle risque de faire passer celui qui la fait pour un centrosomocentriste (comme on pourrait dire anthropocentriste) : l'organisation cellulaire des vertébrés semble trouver un équivalent dans l'organisation du corps. En effet, le système nerveux, qui a un rôle de contrôle, est centré et les extensions qui lui servent à exercer ce contrôle sont principalement fondées sur les propriétés des microtubules et des moteurs microtubulaires (il y a évidemment de l'actine dans les neurones et elle a un rôle fondamental dans la plasticité neuronale). En revanche, les organes moteurs, les muscles, ne contiennent presque que de l'actine et de la myosine. De même, au niveau cellulaire (dans les cellules somatiques de vertébré), le moteur est constitué d'actine et de myosine, et la présence

d'un centrosome génère une organisation radiale des microtubules, qui ont plutôt un rôle de transport (qui peut en particulier constituer un transport d'information). Ainsi, les euarthropodes qui ont un exosquelette sont en cela plus proches de l'organisation des plantes. Ils n'ont d'ailleurs pas non plus un système nerveux aussi centralisé que celui des vertébrés, mais un ensemble de ganglions répartis sur la longueur du corps, avec un ganglion un peu plus gros au niveau de la tête.

Ainsi il faut étendre avec précaution aux vertébrés les résultats venant de cet organisme modèle qu'est la drosophile. Malheureusement, l'autre organisme modèle fécond en matière de développement est aussi un cuticulate - le nématode *Caenorabditis Elegans* - qui possède lui aussi un centriole un peu modifié : il ne comporte que des singulets de microtubules au lieu des triplets, comme les apicomplexés (dont c'est un caractère dérivé propre) – non pas que cette différence dans le nombre de microtubules centriolaires constitue une hérésie particulièrement grave qui vaudrait à ce pauvre vers une quelconque excommunication de l'Eglise Centriolienne, mais aux vues de la conservation de ce caractère au sein des eucaryotes, cette modeste divergence pourrait constituer le signe de l'absence d'une contrainte évolutive très forte existant chez les autres eucaryotes, or l'absence de cette contrainte pourrait avoir d'autres conséquences plus importantes, invisibles au niveau ultrastructural, sur la place qu'occupe le centrosome dans l'économie cellulaire.

Le spermatozoïde de *C. elegans* ne possède pas non plus de flagelle. Et même si cet organisme possède quelques cils modifiés servant de chémorécepteurs, ces cils ne sont pas motiles. *C. elegans* ne possède donc aucun axonème motile. La contrainte qui impose la conservation de triplets ou de doublets de microtubules pour le centriole pourrait donc être la présence d'un axonème motile – cette considération pourrait servir de guide dans l'étude du rôle des corps basaux dans la motilité axonémale. Les apicomplexés, qui sont des parasites unicellulaires n'ont en général pas non plus de flagelle ou de cils, sauf certains gamètes mâles

qui sont très petits et sont produits dans une sorte de kyste à proximité des gamètes femelles. Il serait intéressant de savoir si leur flagelle est motile.

La relation entre la présence d'un axonème et celle d'un centriole n'est cependant pas bijective dans la mesure où certains eumycètes semblent avoir conservé des centrioles alors qu'ils n'ont plus de cils ni de flagelles (les chytridiomycètes) et qu'un certain nombre de types cellulaires chez les vertébrés conservent aussi des centrioles sans jamais assembler un axonème. De même, les cellules somatiques de drosophile ont conservé un centriole, même s'il est plus court, alors que cet organisme ne possède aucun cil ou flagelle et d'autres euarthropodes ne fabriquent même pas de spermatozoïde flagellé. La conservation de centrioles en absence d'axonème pourrait alors s'expliquer par une perte tardive des axonèmes - comparativement aux levures par exemple - et par une évolution plus lente. Mais cette conservation pourrait aussi refléter, chez ces organismes, une exploitation de la structure centriolaire à d'autres fins que la nucléation d'axonèmes, imposant de nouvelles contraintes à leur évolution.

Si on interprète le changement de longueur du centriole (son rétrécissement chez la drosophile par exemple) par une évolution vers la plaque due à l'absence d'axonème, on peut penser que posséder des corps basaux suffisamment longs est important pour le fonctionnement de l'axonème. On pourrait tester cette idée en injectant des centrioles de longueurs différentes et en essayant de corréler la longueur des centrioles et leur capacité parthénogénétique chez le xénope. On sait déjà que des centrioles de drosophile ne sont pas compétents. Il faudrait les comparer à d'autres centrioles plus longs, appartenant à des espèces tout aussi éloignées évolutivement.

De même, l'idée que l'existence de triplets ou de doublets soit importante non pas pour l'assemblage, mais pour le battement des axonèmes pourrait être renforcée s'il était possible

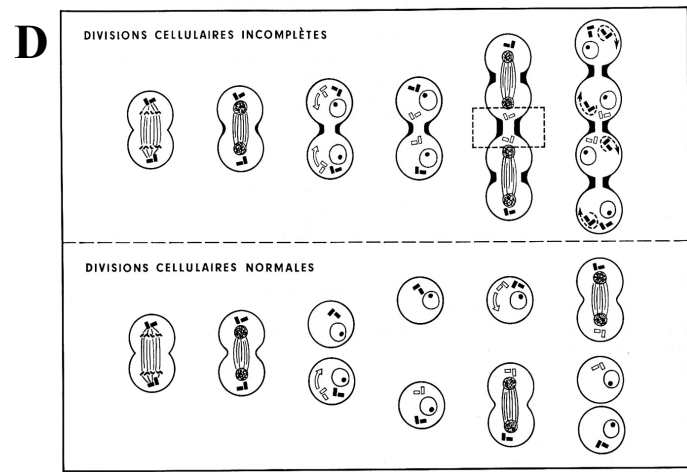
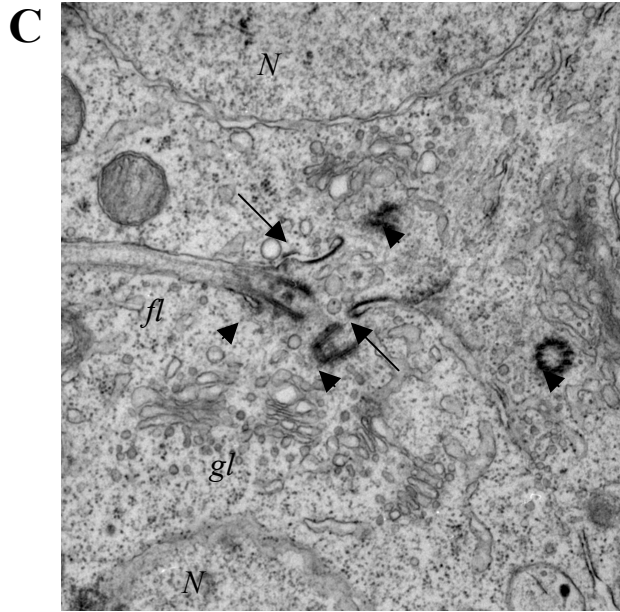
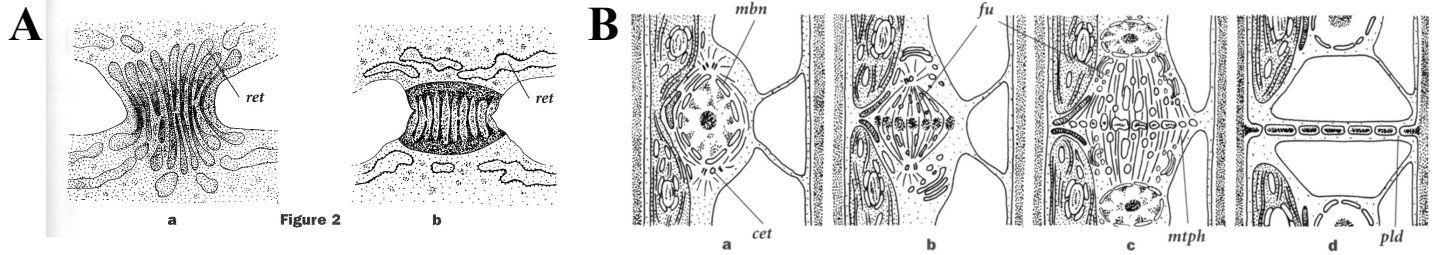
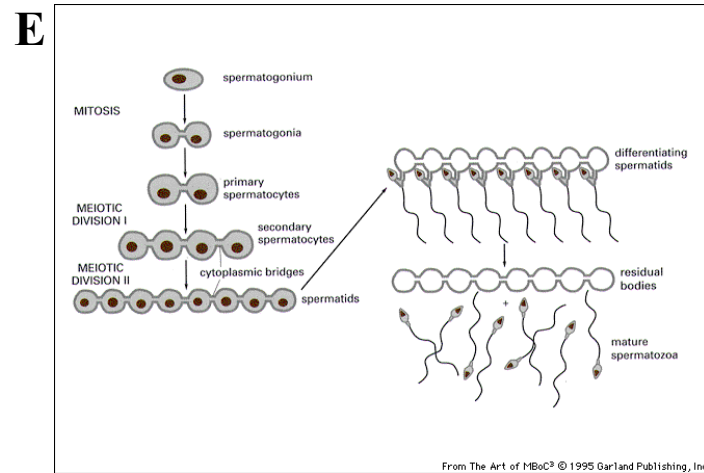
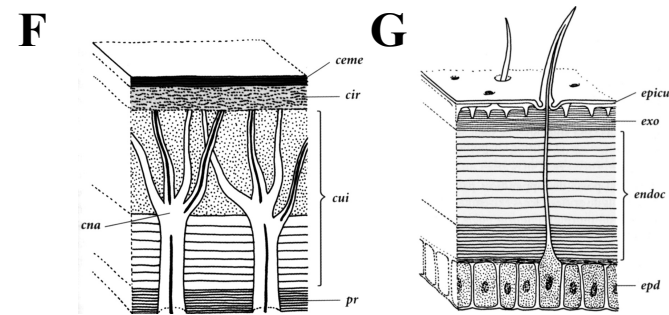
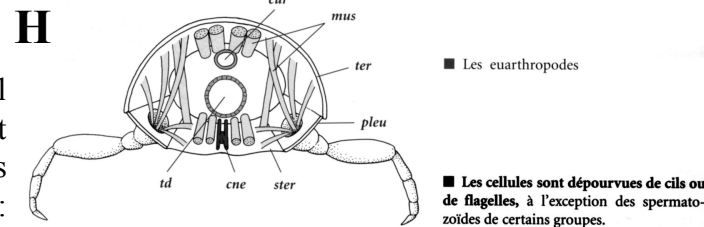


FIG. 9. Ce schéma, inspiré de Gondos et Zamboni (12), montre, dans la partie supérieure, comment les deux premières divisions incomplètes d'une cellule-souche peuvent aboutir à la formation de quatre cellules au même stade de différenciation. La partie encadrée en pointillé montre comment le cas de la Fig. 4 peut se trouver réalisé. L'absence de synchronisation est illustrée dans la partie inférieure : divisions cellulaires normales à cytotidérèse complète.



From The Art of MBoC © 1995 Garland Publishing, Inc.



■ Les cellules sont dépourvues de cils ou de flagelles, à l'exception des spermatozoïdes de certains groupes.

### Figure 39: Quelques illustrations

A : La division interrompue des rhodobiontes (dont un caractère dérivé propre est l'absence de centriole).

B : Le phragmoplaste des plantes terrestres.

C-E: Un bel exemple de proximité de l'appareil moteur, de l'appareil de scission et de l'élément génétique reliés par le centrosome dans un processus visant à la dissémination lors de la spermatogenèse. C: Image en microscopie électronique de la mitose interrompue dans le ciste qui se forme lors de la spermatogenèse. On distingue bien les quatre centrioles (têtes de flèche) à proximité du pont cytoplasmique reliant les cellules filles (flèches). Un des centriole est associé à un flagelle (*fl*) en formation. On voit aussi des saccules de l'appareil de golgi (*gl*) et les noyaux (*N*). D : Schéma résumant les observation faites sur ce système. E : Schéma général de la spermatogenèse (C et D: Clérot, 1971).

F-H: Centriole et axonème. F: L'épiderme des cuticulates. G : Celui des ecdysozoaires (qui font partie des cuticulates), il n'y a plus de cellules ciliées dans l'épiderme. H: L'exosquelette des euarthropodes, qui n'ont plus ni cils ni flagelles (A, B, F-H, Lecointre et Leguyader, Classification phylogénétique du vivant, 2001).

de savoir si les apicomplexés, qui comme les nématodes ont des centrioles formés de singulets de microtubules, partagent aussi avec eux l'absence de cil ou de flagelle motile.

On a donc pu, en suivant le fil de l'identité centriole/corps basal, arriver à la conclusion que la présence d'un axonème motile s'accompagne toujours de la présence d'un centriole canonique, que la longueur du centriole est liée à la longueur de l'axonème (d'un point de vue mécanique, si le centriole doit exercer une quelconque influence sur le battement de l'axonème, cette relation des longueurs se conçoit très bien, car plus le centriole est long, plus le couple sera important si la force est exercée au bout proximal, là où se situent les fibres contractiles), et que la présence de triplets ou de doublets sur le centriole est nécessaire à la formation d'un axonème motile (c'est peut-être aussi une trivialité dans la mesure où la force qui génère le battement de l'axonème est justement produite par le glissement d'un microtubule d'un doublet sur son voisin du doublet suivant, et que cette 'spécialisation' n'est possible qu'à partir de deux microtubules – un des microtubules porte les moteurs qui courent sur un autre). Enfin, la présence de centrioles dans des cellules ne possédant pas d'axonème peut s'interpréter par l'existence d'une autre fonction attachée à ces structures dans certaines espèces.

### Plaques et endomitose

Une autre corrélation est intéressante : les organismes qui ont des centrosomes à plaques font presque toujours des endomitoses (la membrane nucléaire ne s'ouvre pas). On comprend bien alors la stratification du centrosome, puisqu'il y a clairement un intérieur et un extérieur délimités par une membrane, donc par un plan à l'échelle du centrosome. En fait, à partir de cette observation, on peut se rendre compte que c'est le cas pour les autres corpuscules fusoriaux ou pôles, qui ont aussi des sous-régions spécialisées soit dans l'organisation des microtubules du fuseau, soit dans l'organisation des microtubules astraux, ce qui leur confère



aussi un aspect stratifié (que l'on peut révéler en décorant certaines molécules, Kuntziger et al., 2001b). Néanmoins, quand la mitose se fait sans membrane nucléaire, la géométrie reste sphérique et on observe plutôt des boules ou des dômes que des plaques.

Plus généralement, l'étude de la relation entre le type de mitose et la géométrie des pôles éclaire le rôle des pôles dans le positionnement du fuseau à l'intérieur de la cellule (voir la figure 38 qui montre plusieurs types de mitoses et différents corpuscules polaires). Les diverses sous-parties du pôle sont particulièrement apparentes chez les unicellulaires flagellés qui présentent tous les types de mitose imaginables –ouverte, fermée, semi-ouverte, avec les centrioles aux pôles ou pas et d'autres types de structures intranucléaires ou insérées dans la membrane nucléaire. Il y a toujours une structure qui prend en charge les chromosome, une autre qui s'ancre au cortex et un lien entre les deux, souvent constitué de fibres contenant une protéine très conservée, la centrine. On peut noter une exception qui confirme l'importance des structures polaires pour le lien du fuseau au cortex cellulaire : dans les plasmodes, qui ne se divisent pas, il n'y a souvent pas de structure polaire particulière.

#### *Autres facteurs qui semblent accompagner les modifications du centrosome et donc l'absence de cils*

L'absence de cils ou de flagelles permet l'évolution du centriole, mais vers quelles formes ? Et quelles autres modifications peut-on corrélérer à ces évolutions ? Dans ce qui suit, je vais exposer un certain nombre de corrélations qui m'ont frappé. Je me suis évidemment intéressé aux mécanismes qu'on associe habituellement au centrosome comme la motilité cellulaire et la mitose. J'ai noté ces corrélations quand d'autres arguments permettaient de penser qu'elles n'étaient peut-être pas fortuites. Il faudrait cependant faire une étude beaucoup plus sérieuse avant de tirer une quelconque conclusion de ces remarques.

Centrosome et motilité cellulaire : le centrosome interphasique.

Les cellules qui n'ont pas de cils ou de flagelles sont soit immobiles, comme les cellules de plantes ou les eumycètes et elles possèdent alors une paroi externe, soit mobiles, mais elles ont alors développé une autre forme de locomotion basée non plus sur le couple microtubule/dynéine de l'axonème mais sur le couple microfilament/myosine du muscle ou du pseudopode. Ainsi, parmi les streptophytes, il existe deux types de gamètes : les gamètes flagellés (qui caractérisent la zoïdogamie, ce qui est un caractère dérivé propre de ce phylum) et les gamètes amiboïdes (les zygnématophytes, ou les anthophytes qui pratiquent la siphonogamie) qui n'ont pas de centriole. Ainsi la perte des centrioles se fait en deux temps : tout d'abord perte dans les cellules somatiques chez les streptophytes corrélée avec la perte des cils et l'apparition d'une paroi cellulaire puis perte des centrioles et des flagelles des spermatozoïdes chez les anthophytes ou les pinophytes. Ces espèces font partie des spermatophytes qui ont réduit le rôle du flagelle de la gamète mâle à presque rien en les disséminant dans des graines de pollen qui les approchent du gamète femelle grâce au tube pollinique. Chez les pinophytes et les anthophytes, le tube pollinique amène le gamète non flagellé jusqu'à l'oosphère. Chez les zygnématophytes, il y a aussi perte des cils des cellules somatiques (ce sont aussi des streptophytes).

Au niveau cellulaire, il y a donc une stratégie radicalement différente entre les cellules flagellées ou ciliées et les autres : l'appareil moteur n'est plus extérieur et n'impose plus automatiquement la direction du mouvement. Cela s'accompagne aussi de l'internalisation du centrosome quand il y en a un. On imagine bien que si le centrosome est un lieu d'intégration important pour la motilité dirigée et si la force motrice est répartie sur tout le contour de la cellule, l'intégration doit se faire à partir d'un 'centre'. Ce centre est défini par l'organisation radiale polarisée des microtubules. En revanche, quand il y a un axonème, la régulation de la motilité peut se faire à la base de l'axonème. Ainsi, on peut refaire le raisonnement de

Zimmermann qui avait déduit de l'identité entre corps basaux et centrioles que ces derniers avaient aussi dans le centrosome des cellules amiboïdes un rôle dans la locomotion. Mais, alors qu'il proposait un rôle dans la production de force, on proposera plutôt un rôle dans la régulation de la motilité et particulièrement de la directionnalité. On peut donc avancer que le corpuscule centré qui fut appelé centrosome par les premiers cytologistes, dérive des cinétosomes et s'est déplacé définitivement du cortex de la cellule vers son centre avec la perte des flagelles et l'apparition du mouvement amiboïde. De nombreuses cellules sont capables de faire l'aller-retour entre des formes amiboïdes et des formes flagellées et leurs centrioles passent alors du cortex au centre et vice-versa. Il est intéressant de prendre l'exemple de cellules de vertébrés qui assemblent des cils primaires : elles conservent un mouvement amiboïde, et le cils ne sert pas à propulser la cellule. Dans ce cas, le centrosome, après s'être associé à la membrane plasmique, retourne au centre de la cellule. On peut voir dans ce recentrage un indice pour penser que le centrosome a gardé, dans le mouvement amiboïde, un rôle de régulation de la motilité cellulaire. Dans tous les cas où les cellules abandonnent toute forme de motilité, l'existence d'un corpuscule central et l'organisation centrée des microtubules ne sont plus observées. C'est vrai des espèces qui n'ont jamais de motilité, comme les cellules somatiques des plantes et des champignons. C'est vrai de cellules qui peuvent adopter transitoirement la forme de plasmodes, comme *Physarum* - la cellule désassemble alors aussi bien la boule qui lui sert de MTOC que ses centrioles (qui persistent dans la forme amiboïde mais ne sont pas au centre de l'aster de microtubules). C'est aussi vrai de certaines cellules de vertébrés comme les myotubes. Dans tous ces cas, les microtubules sont alors plus étroitement associés au noyau ou à la paroi cellulaire. Dans les plasmodes de *Physarum* (Solnica-Krezel et al., 1990), dans de nombreuses cellules de plantes (Lambert, 1993; Vaughn and Harper, 1998) et dans les myotubes (Tassin et al., 1985), les protéines qui sont habituellement associées aux centrioles se retrouvent à la périphérie du noyau et les

microtubules irradient à partir de la membrane nucléaire où sont localisés leur bout moins, vers les parois. Ainsi, l'organisation radiale des microtubules est conservée et définie autour du noyau une polarité (on peut aller vers le noyau ou s'en éloigner). En revanche, il ne semble plus nécessaire d'organiser les microtubules à partir d'un corpuscule séparé et plus ou moins indépendant du noyau.

#### Centrosome et cytokinèse : l'individuation

Quand il y a disparition totale du centrosome, il y a aussi souvent un changement dans le mode de division : les algues rouges font des cytokinèses interrompues –c'est à dire qu'il n'y a pas fusion des membranes au niveau du pont cytoplasmique reliant les cellules filles (voir la figure 39). Au lieu de cela, un bouchon protéique est sécrété qui assurera l'étanchéité entre les cellules filles. Les zygnématophytes forment soit des filaments, soit des sortes de doublets de cellules reliées par un fin pont cytoplasmique. De même, les streptophytes, dont les cellules somatiques n'ont pas de centrosome, regroupent une espèce qui forme des amas cellulaires amorphes (les chlorokybophytes dont les cellules restent associées après la mitose, sauf pour la production de spores flagellés), des espèces qui forment des filaments non branchés qui rappellent les grappes de levures ayant un problème tardif de cytokinèse, et les phragmoplastophytes qui ne se divisent pas par constriction de la membrane plasmique, mais par construction d'une nouvelle paroi (le phragmoplaste) entre les deux cellules filles, du centre vers les bords. Enfin, les formes plasmode des mycétozoaires n'ont pas de corpuscule particulier aux pôles du fuseau.

On peut développer à partir de ce qui précède et du rôle dans le contrôle de la cytokinèse attribué au centrosome chez les levure (voir aussi le papier 2 et la discussion qui suit) l'idée que le centrosome pourrait servir à la définition d'une entité cellulaire autonome. Les cellules de plantes qui forment en fait un syncytium (elles sont reliées par des plasmodesmes qui sont

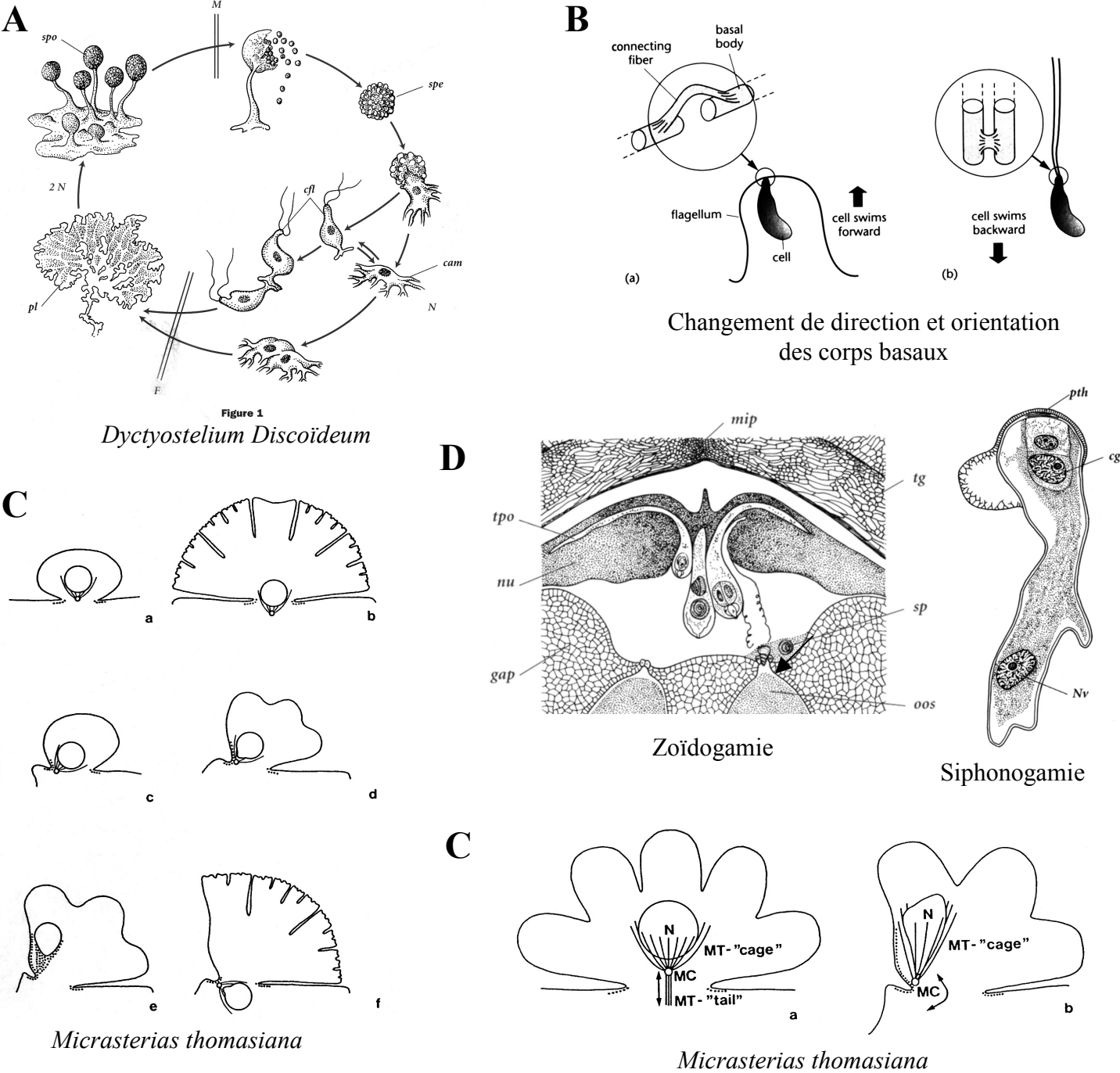


Figure 1  
*Dictyostelium Discoideum*

Changement de direction et orientation des corps basaux

Zoïdogamie

Siphonogamie

*Micrasterias thomasiana*

*Micrasterias thomasiana*

**Figure 40: Quelques illustrations (suite)**

A: Alternance de phases unicellulaires flagellés ou amiboïdes qui se comportent comme des gamètes et peuvent fusionner pour ensuite donner un plasmode (une cellule plurinucléée ou un organisme pluricellulaire) qui peut former des spores.

B: Une fibre contractile relie les deux corps basaux de cellules biflagellées comme *Chlamydomonas*. Quand elle se contracte, le battement flagellaire est modifié.

C: Le zygématophyte *Micrasteria* possède un corpuscule associé au noyau qui organise ses microtubules en aster et est important pour la détermination de la position du noyau et par suite pour le développement d la cellule. Un mutant (c-f à gauche et b à droite) dont le MTOC se colle au cortex, ne développe qu'une demi corolle.

D: Les deux types de sexualité des plantes à graine de pollen : la zoïdogamie (la graine de pollen dépose des gamètes flagellées), ou la siphonogamie (la graine de pollen développe un tube pollinique qui conduit les gamètes mâles jusqu'à l'oosphère)

A, C et D : Lecointre et Le Guyader (2001); B: Bray (201).

des canaux aménagés lors de la formation du phragmoplaste), ne sont pas individualisées. Un ovocyte énucléé mais qui contient un centrosome peut former des cellules individuelles (Picard et al., 1988), alors qu'un ovocyte qui contient un noyau et pas de centrosome fait des cycles et des mitoses mais ne se divise pas. De même, dans le syncytium de l'embryon de drosophile, il a pu être observé que, si la réplication de l'ADN est inhibée par une drogue, les centrosomes continuent à se dupliquer, mais ne sont plus solidaires des noyaux. Au moment de la cellularisation, les centrosomes peuvent migrer seuls vers le cortex et provoquer l'excision amitotique d'un volume équivalent à celui d'une cellule mais ne contenant pas de noyau (Raff and Glover, 1989). De même, des lymphocytes humains qu'on empêche de se diviser avec de faibles doses de cytochalasine D, contiennent au bout de quelques jours des dizaines de noyaux et de centrosomes. Un rassemblement des centrosomes près du cortex peut alors être observé, et il arrive qu'ils s'excisent (M.Moudjou et M.Bornens, résultats non publiés). On a déjà parlé des monocytes qui peuvent se reformer sans mitose à partir de cellules géantes qui, contrairement aux myotubes ont conservé leurs centrosomes. Enfin, chez les ciliés, chaque cinétosome définit une zone qui constitue une unité élémentaire du cortex, qui se reproduit à chaque cycle et que l'on pourrait comparer à une cellule de métazoaire.

Cette théorie due à Michel Bornens est très séduisante et se combine bien à celle du rôle du centrosome dans la motilité. En effet, au niveau cellulaire, un pré-requis au mouvement est l'individuation. Il se trouve que les organismes multicellulaires doués de mouvement sont aussi formés de cellules individualisées dont beaucoup sont elles-mêmes motiles. Les organismes multicellulaires qui ne sont pas doués de motilités (comme les plantes) sont composés de cellules qui ne sont pas elles-mêmes motiles et sont toutes connectées. Les seules cellules motiles de ces organismes sont les spermatozoïdes, qui contiennent un centrosome et s'individualisent (pour former un autre organisme ailleurs). Ce raisonnement est valable 'par défaut' pour les plantes, mais on a vu que certaines plantes ont contourné ce couple

individuation/motilité en produisant des gamètes immotiles qui sont transportées dans des graines (par le vent ou par les animaux qui les ingèrent).

### **- Centrosome et corpuscule fusorial : le centrosome mitotique**

Chez tous les eucaryotes, la mitose passe par l'assemblage d'un fuseau bipolaire composé de microtubules. Le fait que, dans la plupart des cas, les centrosomes que l'on peut définir par des centrioles ou des structures bien définies se placent aux pôles du fuseau a conduit à assimiler le corpuscule fusorial au centrosome. C'est un autre moyen de définir le centrosome, mais on ne considère pas ces particules comme des centrosomes dans toutes les espèces, dans la mesure où on ne les retrouve pas en interphase. Les corpuscules fusoriaux des vertébrés sont assimilés au centrosome grâce à la présence des centrioles dont la conservation est probablement liée à l'utilisation de cils et de flagelles par un grand nombre de cellules de ces organismes. De même, la structure en plaque ou SPB que l'on observe dans d'autres organismes est visiblement liée au mode de mitose particulier (endomitose). Ainsi un organisme libéré de ces deux contraintes (besoin d'assembler des cils et endomitose) ne conservera pas forcément un corpuscule fusorial ayant une structure bien identifiable et il est donc difficile de le définir en dehors de la mitose. Pourtant, si ces corpuscules fusoriaux sont des dérivés du centrosome, on peut imaginer qu'ils perdurent, se dupliquent et se ségrègent correctement, mais ils ne sont pas forcément localisés au centre de la cellule et n'ont pas forcément de structure identifiable. En effet, cette localisation centrale dépend de la géométrie de la cellule et peut être perdue, même chez les vertébrés, dans certaines cellules différenciées. Ces corpuscules ne sont pas forcément non plus associés aux microtubules en interphase (comme dans les cellules neuronales, même si les microtubules sont nucléés à proximité) et on ne connaît pas forcément de marqueur moléculaire pour les retrouver dans le volume cellulaire. La question est la suivante : si l'absence de centriole et de corpuscule centré

organisant les microtubules dans les cellules de plante est bien établie, n'existe-t-il pour autant aucun corpuscule fusorial persistant et qui se reproduirait par duplication ? Si l'existence d'un tel corpuscule est prouvée, entrera-t-il dans la famille des centrosomes ? C'est à dire : peut-on définir un centrosome par son rôle de corpuscule fusorial persistant et reproduit par duplication ? En tout cas, on pourra être quasiment sûr qu'un tel corpuscule est un dérivé du centriole, à cause de son mode de reproduction par duplication (voir plus loin). Cependant il semble peu probable que l'on découvre un tel corpuscule dans les plantes terrestres, tous les rôles attribués aux pôles semblant être assurés par la paroi cellulaire. On peut quand même rapporter l'étrange cas des algues vertes zygnématophytes : elles ne possèdent jamais de centriole, mais certaines (les *Micrasterias*, voir la figure 40) possèdent un corpuscule associé au noyau en interphase, ainsi qu'aux microtubules et qui semble avoir un rôle dans la migration du noyau lors du développement de cet organisme (Meindl, 1983; Meindl, 1985, et voir la figure 40). Rien n'est connu quand à une potentielle duplication de cet organe.

### **- Conclusion**

Une étude phylogénétique approfondie du centrosome pourrait apporter beaucoup à l'élucidation de son rôle dans l'économie cellulaire. Une telle étude n'est malheureusement pas possible car on ne dispose pas de données concernant les centrosomes d'un nombre suffisant d'espèces (il serait intéressant de connaître d'autres exemples de centrosomes d'euarthropodes).

On peut à ce stade se convaincre du lien qu'il y a entre la conservation des axonèmes et celle des centrioles. On a pu aussi se rendre compte que la définition du centrosome repose en fait plus sur un type d'organisation intracellulaire particulier et qu'on doit abandonner certaines caractéristiques du centrosome de vertébré si on veut identifier ses équivalents dans d'autres espèces (on doit en particulier abandonner son caractère central). Dès lors, on a pu identifier



quelques autres caractères qui semblent co-évoluer avec le centrosome, comme le mode de division et s'interroger sur les différences d'organisation intracellulaire qui peuvent exister entre des cellules possédant une paroi ou n'en possédant pas. Il faudrait pouvoir faire une sorte de diagramme de phase – mais comment choisir les paramètres ? - pour comprendre les conditions dans lesquelles une organisation intracellulaire impliquant l'existence d'un 'centre' (pas forcément géométrique) est favorisée.

Les critères utilisés dans cette partie pour comparer les centrosomes sont souvent des critères ultrastructuraux, qui sont ceux sur lesquels se fonde habituellement la définition de ces organites. On verra plus loin ce qu'on peut essayer de tirer de comparaisons moléculaires ou fonctionnelles.

## **2. Le SPB de *S.cerevisiae* : le centrosome le mieux connu et une source d'inspiration constante pour l'étude du centrosome des autres organisme**

### **- Structure et composition**

Le centrosome de la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* est dénommé d'après son rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique : le 'spindle pole body' – que l'on traduit par 'corpuscule fusorial' ou par 'corpuscule polaire'. C'est un corpuscule organisé en plaques et inséré dans la membrane nucléaire. Il se reproduit par duplication, une nouvelle plaque étant nucléée au bout d'une structure associée à l'ancienne, appelée le demi-pont. L'amorce de plaque s'allonge dans le cytoplasme puis est insérée dans la membrane nucléaire et se sépare par rupture du pont pour former le deuxième pôle du fuseau mitotique. Il semble que le corpuscule le plus ancien emporte avec lui le pont (J. Kilmartin, communication personnelle). La composition de ces plaques est bien connue. Elle a été obtenue grâce au séquençage

protéique d'une préparation purifiée de SPB (Wigge et al., 1998). C'est le seul centrosome pour lequel autant d'outils moléculaires et génétiques sont disponibles, si bien que son fonctionnement est beaucoup mieux connu que celui du centrosome des vertébrés. Il comporte de nombreuses protéines dont les homologues sont associées au centrosome des vertébrés, comme les protéines du petit complexe  $\gamma$ -tubuline (Tassin et al., 1998) ainsi qu'une centrine qui se localise dans le demi-pont (Baum et al., 1986; Huang et al., 1988) et de grandes protéines à domaines 'coiled-coil' pour lesquelles les homologues sont plus spéculatives (Tassin et al., 1997). Néanmoins, ces grandes protéines jouent des rôles qui sont proches de ceux suspectés pour les protéines à domaines 'coiled-coil' du centrosome : ancrage des complexes  $\gamma$ -tubuline - et donc des microtubules - sur la structure centrale (Spc 72, Stu2, , ancrage de protéines de voies de transduction ou de régulation (Bub2, Nud1 etc...pour une revue, voir Francis and Davis, 2000). De plus, ces protéines s'accrochent sur la structure centrale par leur extrémité C-terminale, or de nombreuses protéines à domaines coil-coiled du centrosome des vertébrés ont un domaine d'adressage qui se trouve aussi à l'extrémitée C-terminale. La structure centrale du SPB est particulière et on ne connaît pas d'homologue des protéines qui la compose. Il semble qu'elle soit formée d'un cristal protéique bidimensionnel qui contient la protéine spc42 et dont la nucléation est assurée par le demi-pont et contrôlée par la kinase Mps1, dont l'homologue chez les vertébré contrôle aussi l'assemblage des centrosomes (Fisk and Winey, 2001).

### **- Fonctions avérées**

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le centrosome est formé d'un seul corpuscule dont on ne peut isoler de sous-parties fonctionnelles, ce qui simplifie l'analyse. Ainsi, le SPB est le seul point de nucléation et d'ancrage des microtubules dans la cellule. Sa plaque interne organise les microtubules nucléaires et sa plaque externe les microtubules cytoplasmiques (Schiebel,

2000). Les fonctions que l'on peut attribuer à ces propriétés d'ancrage sont identiques à celles que l'on trouve chez les vertébrés : position du noyau en mitose, en interphase et lors de la fusion des gamètes haploïdes.

La simplicité de la structure et le nombre réduit de composants a permis une analyse souvent poussée des mécanismes moléculaires : les étapes précises de l'assemblage des composants (Adams and Kilmartin, 1999; Adams and Kilmartin, 2000), la régulation par la calmoduline à la transition interphase/mitose (Geiser et al., 1993; Stirling et al., 1994), les régulations par phosphorylation (Spc 42, qui compose la plaque centrale, doit être phosphorylé par Mps1 pour s'assembler correctement, Donaldson and Kilmartin, 1996), le contrôle de la duplication, etc...Il commence à y avoir des données sur la régulation transcriptionnelle des composants du SPB (Spellman et al., 1998).

Un rôle subtil de la localisation au SPB de certaines protéines importantes pour les contrôles de sortie de mitose vient d'être compris (voir la discussion du papier 2), mais il ne semble pas que le SPB soit impliqué dans autant de voies de signalisation que son homologue chez les vertébrés. On ne trouve pas autant de protéines de signalisation concentrées au SPB (les MAPK ne s'y localisent pas par exemple). Le SPB pourrait même nous renseigner sur les fonctions du centrosome liées à la motilité cellulaire, dans la mesure où les questions de polarité (impliquée dans la conjugaison, les levures étant douées de chimiotropisme) et de motilité impliquent des mécanismes semblables.

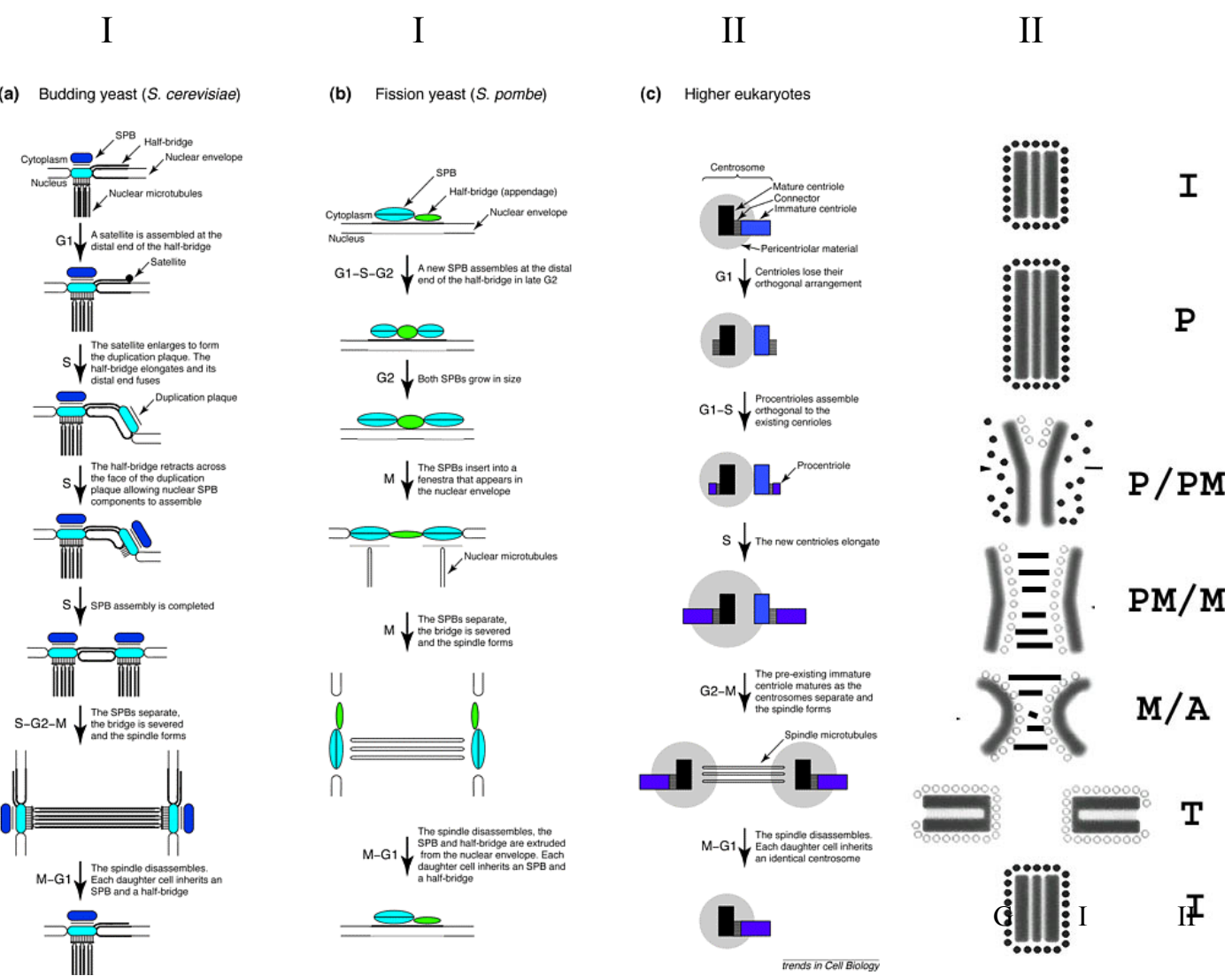
Quelques criblages génétiques ont permis de trouver des mutants du SPB : le criblage des défauts du cycle de division (cdc, avec les protéines cdc31, mps1, mps2, Baum et al., 1986; Winey et al., 1991) ou le criblage des défauts de karyogamie (kar, avec la protéine kar1, qui se trouve être associée à cdc31 dans le demi-pont, Rose and Fink, 1987).

## - La 'levure verte'

Le SPB des ascomycètes n'est qu'un très lointain dérivé du centriole. Malgré la conservation d'un certain nombre de molécules liées à la nucléation des microtubules ou à des phénomènes de régulation, on peut donc s'attendre à ce que les protéines importantes pour l'assemblage des centrioles soient absentes.

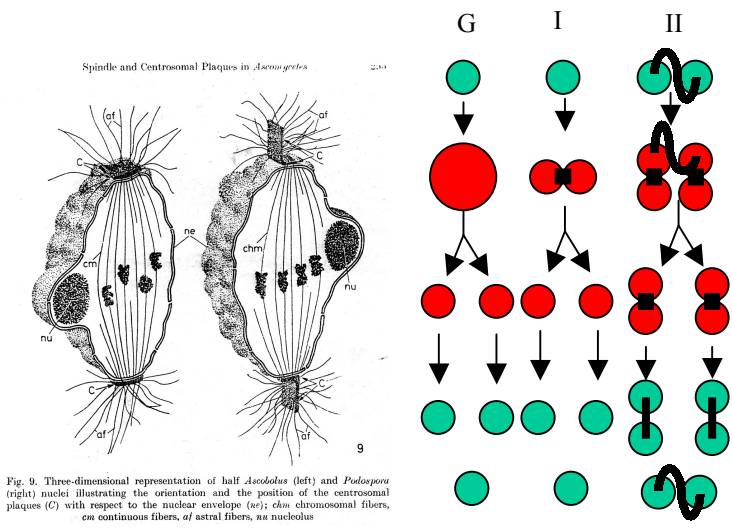
L'organisme qui permet l'étude génétique des centrioles est l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Marshall and Rosenbaum, 2000). Son étude a permis d'isoler de nombreux constituants centrosomaux, parmi lesquels la seule protéine connue ayant un rôle dans la formation des triplets de microtubules : la  $\delta$ -tubuline, isolée à partir d'un criblage génétique des défauts du nombre de flagelles. La  $\delta$ -tubuline correspond au mutant uni3, qui produit des cellules avec zéro, un ou deux flagelles selon un mode régulier qui suggère un problème de maturation des centrioles (Dutcher and Trabuco, 1998).

La présence de centrioles rend un certain nombre de correspondances plus immédiates. Ainsi, les fibres associées aux centrioles, qui sont très proéminentes chez de nombreux unicellulaires flagellés pourraient avoir pour équivalent chez les vertébrés les liens qui relient les centrioles entre eux et au noyau et qui restent jusqu'à présent très mal caractérisés. Le mutant vfl2 comporte un défaut de cohésion entre les centrioles, qui se retrouvent aléatoirement ségrégués lors de la mitose (Wright et al., 1983). Ce mutant porte une mutation dans le gène codant une protéine présente chez quasiment tous les eucaryotes : la centrine. Cette protéine est le composant principal de fibres qui relient les centrioles entre eux par leur bout distal et de fibres qui relient le cinétosome au noyau (nucleus basal-body connectors, Wright et al., 1985). C'est grâce à la purification de ces fibres qu'elle a été identifiée (Salisbury et al., 1984). Plus récemment, d'autres protéines de ces fibres ont été identifiées, par exemple p210, composant d'une fibre reliant les bouts distaux des centrioles à la membrane plasmique (Lechtreck and Grunow, 1999). Les criblages génétiques ayant trait aux centrioles chez cette algue verte



**Figure 41: Comparaison de la duplication de plusieurs types de centrosomes**

Ci-dessus, trois cas classiques et très étudiés: les deux levures (*S.pombe* et *S.cerevisiae*) et le centrosome des métazoaires ou, en général, des organismes à centrosome centriolaire (Adames et Kilmartin, 2000). A droite est présentée la duplication du centrosome de *Dyctyostelium* (le NAB), tirée de Ueda et al. (1999). Ci-contre un exemple très particulier de centrosome à plaques d'un ascomycètes. Deux endomitoses sont représentées à chaque pôle de l'organisme représenté à droite (*Podospora*) sont formées de deux plaques à angle droit l'une de l'autre (Zickler, 1970). Enfin, ci-dessus à droite, un schéma générique (G) de la duplication du centrosome. Puis deux cas particuliers pour des centrosomes contenant un (I) ou deux (II) corpuscules.



**Fig. 9. Three-dimensional representation of half *Ascododus* (left) and *Podospora* (right) nuclei illustrating the orientation and the position of the centrosomal plaques (C) with respect to the nuclear envelope (ne); chm chromosomal fibers, cm continuous fibers, af astral fibers, nu nucleolus**

portent le plus souvent sur des défaut dans le nombre de flagelles. On peut citer les mutants bald qui n'ont pas de flagelle (Ehler et al., 1995) les mutants vfl qui en ont un nombre variable et les mutants uni qui n'ont qu'un flagelle et sont souvent associés à des problèmes de maturation du centriole (il s'assemble mais plus lentement et ne devient fonctionnel qu'un cycle plus tard, Huang et al., 1982).

### **3. Analyse comparative du mode de reproduction de quatre types de centrosome**

Les quatre exemples choisis (voir la figure 41) représentent les quatre types de centrosome qui ont été l'objet d'une étude approfondie : les centrosomes à centrioles, qui se reproduisent tous à peu près sur le même schéma, trois exemples de centrosomes à plaques dont un qui est toujours inséré dans la membrane nucléaire (le SPB de la levure *S.cerevisiae*,) et deux qui ne s'y insèrent que pour la mitose (le SPB de la levure *S.pombe* et le NAB de l'amibe grégaire *D.discoïdeum*). On peut trouver des centrosomes à centrioles dans les systèmes eucaryotes les plus éloignés évolutivement et leur reproduction est la même. On a vu que la conservation de la structure centriolaire semblait liée à la conservation de l'axonème. On peut se demander si la reproduction de la structure complexe des centriole ne nécessite pas quelques particularités, qui devraient être absentes de la reproduction des centrosomes à plaque. L'amibe *D.discoïdeum* et les deux levures font partie de phylums qui se séparent à la racine du phylum des eucaryotes et les deux levures ont entre elles une distance évolutive que certains estiment à presque un milliard d'années. On a donc là un échantillon d'espèces très divergentes et on peut penser que les caractéristiques communes de leurs modes de reproduction reposent sur des principes particulièrement importants à comprendre.

On peut noter aussi que les résultats sur lesquels s'appuie la réflexion qui va suivre – principalement la description des étapes de la duplication – ne proviennent pas des mêmes approches expérimentales : ils comportent tous une part importante d'études ultra-structurales, avec en plus pour les centrosomes à centrioles et pour les SPB des levures, l'utilisation de techniques de synchronisation des cellules. Il faut y ajouter, pour les centrosomes à centrioles, l'utilisation de techniques impliquant la purification des centrioles et l'utilisation de milieux de duplication acellulaires, et, pour les SPB, l'utilisation de la génétique et en particulier de nombreux mutants de duplication.

#### **- Un schéma de base très conservé**

Tous les corpuscules présentés se reproduisent par duplication : chaque cellule en possède un exemplaire en interphase et deux en mitose, qui sont chacun associé à un pôle du fuseau. Cela permet de s'assurer que l'on parle bien dans chaque cas d'un centrosome canonique.

Une première chose qui frappe est le fait qu'à chaque fois le nouveau centrosome apparaît à proximité de l'ancien. Asservir l'assemblage d'un nouveau centrosome à la présence d'un ancien est évidemment un bon moyen de restreindre la reproduction à une duplication. Cela requiert donc au moins deux étapes : doublement du centrosome, puis séparation en deux parties (voir la figure 41). Ces étapes doivent être couplées avec le cycle de division cellulaire. Il est assez clair, autant pour les centrosomes centriolaires que pour le SPB de *S.cerevisiae* que l'assemblage d'une nouvelle structure se fait au cours de la phase S (Adams and Kilmartin, 2000), en même temps que la réplication de l'ADN : si des cellules sont bloquées en G1 ou à la bordure G1/S, elles n'assemblent pas de nouveau corpuscule. Dans le cas de *S.pombe*, les choses ont été moins claires pendant longtemps, à cause d'un cycle un peu particulier (il y a une très longue phase G2). Il semble néanmoins finalement que le début de l'assemblage se fasse bien aussi à la transition G1/S.

Le cycle de duplication du centrosome de *Dictyostelium* est en général considéré comme un cas à part (pour une revue voir Graf et al., 2000), l'ensemble de la duplication ayant lieu pendant la mitose. En fait, la séparation des deux plaques semble bien correspondre à ce qui se passe dans les autres espèces au moment de l'assemblage du fuseau mitotique (*S.cerevisiae* correspond à un cas un peu particulier puisque le fuseau commence déjà à se former en S). Ainsi la phase d'assemblage, que l'on considère comme la phase de duplication pour les autres espèces, correspondrait plus simplement chez *Dictyostelium* à l'accroissement de la taille du NAB, qui a lieu juste avant la mitose (les plaques qui sont plutôt cubiques en interphase deviennent, en mitose, cylindriques comme le SPB). Il serait intéressant de savoir si, comme dans le cas des vertébrés cette phase d'accroissement est sous le contrôle de la kinase interphasique. On peut noter ici qu'il y a chez *Dictyostelium* comme chez les vertébrés un troisième évènement, en plus de l'assemblage et de la séparation pré-mitotique : le repliement de la plaque du NAB, qui correspond à la séparation des deux centrioles du centrosome. En fait, il faut plutôt comparer le NAB au centrosome à centrioles qu'aux SPB : les SPB sont constitués d'une seule structure en G1 puis une deuxième s'assemble à proximité alors que, de même que les centrosomes à centrioles contiennent deux centrioles en G1, le NAB contient deux plaques. Et ce sont bien ces deux centrioles, une fois qu'ils auront chacun assemblé un nouveau centriole, et ces deux plaques, une fois qu'elles se seront allongées, qui vont se séparer avant la mitose, chaque nouveau centrosome emportant une partie de l'ancien. En revanche, le nouveau SPB ne contient pas de protéines de l'ancien. A la séparation des deux centrioles, qui a lieu à la fin de la mitose (voir le papier I) correspondrait donc le repliement des plaques du NAB, à la différence près que les centrioles sont ensuite capables de s'éloigner transitoirement l'un de l'autre au cours de la phase G1, alors que les deux plaques restent étroitement associées. D'ailleurs, il faut garder à l'esprit que ces descriptions reposent, en ce qui concerne *Dictyostelium*, principalement sur des observations en



microscopie électronique ou optique, mais que le processus d'élongation n'a pas été encore bien décrit biochimiquement : il se peut très bien que chaque plaque soit en fait constituée de deux parties, une ancienne et une nouvelle, suffisamment associées pour qu'on ne voit pas de discontinuité et que ces deux parties se séparent en fin de mitose pour se réassocier longitudinalement. La seule différence avec la duplication des centrioles serait donc que l'assemblage d'une nouvelle plaque du NAB se ferait dans le prolongement de l'ancienne alors que l'assemblage d'un nouveau centriole se fait perpendiculairement à l'ancien.

Enfin, dans tous les cas, les différents corpuscules qui constituent le centrosome sont étroitement liés. On a déjà vu que les centrosomes de vertébrés, quand ils sont isolés contiennent deux centrioles en G1 et quatre en G2, même si le lien qui relie les centrioles une fois qu'ils se sont séparés à la fin de la mitose n'est pas facilement identifiable. En revanche ces liens sont beaucoup plus développés chez les unicellulaires flagellés ou ciliés et contiennent en majorité la protéine centrine, comme le demi-pont qui relie l'ancien et le nouveau SPB des levures. Cette conservation d'un lien constitué de centrine dans des espèces aussi divergentes que les levures et les algues vertes ou les ciliés, suggère qu'elle joue aussi un rôle dans la cohésion du centrosome des vertébrés, dans lequel elle est présente. En revanche les protéines qui maintiennent ensemble les plaques du NAB ne sont pas connues.

#### **- Ce qui change et ce qu'on peut en conclure**

##### *Orthogonalité des centrioles et orientation du fuseau*

La caractéristique la plus intrigante de la duplication du centrosome centriolaire, l'orthogonalité du nouveau centriole par rapport au centriole parental, ne semble pas partagée par les autres types de centrosome présentés sur la figure 41 (cependant certaines plaques polaires se dupliquent orthogonalement, Zickler, 1970, mais on a vu que l'aspect de 'plaque' est lié à l'endomitose). Trois hypothèses se présentent immédiatement à l'esprit. D'abord

l'hypothèse la plus triviale : l'orthogonalité est importante pour l'assemblage du nouveau centriole, et la perte de cette structure microtubulaire complexe s'accompagne de la perte de l'orthogonalité qui est liée à son mode de reproduction. Ensuite la moins probable : cette orthogonalité est liée à la contrainte évolutive qui pèse sur les centrioles, c'est à dire l'existence d'axonèmes (par exemple, pour assurer la continuité du battement flagellaire pendant la croissance et la division, un nouvel axonème est assemblé à côté de chaque ancien). Toutefois, si quelques cils ont à leur base une paire de centrioles orthogonaux, la plupart n'ont qu'un seul centriole basal. Leur fonctionnement ne semble pas être lié à cette caractéristique. L'hypothèse que je favoriserais personnellement est liée à la mitose : les centrosomes à plaque s'insèrent dans la membrane nucléaire, alors que les centrioles, même quand il y a une endomitose, restent dans le cytoplasme. Puisqu'on a pu se convaincre que les pôles sont importants pour la position du fuseau dans la cellule et que c'est la partie du pôle associée aux centrioles qui joue ce rôle, on peut imaginer que l'orthogonalité des centrioles joue un rôle dans ce processus, en permettant par exemple de définir des axes orthogonaux à l'axe du fuseau.

En effet, le problème que doivent résoudre les pôles du fuseau est de placer l'axe du fuseau en fonction de la géométrie cellulaire (ses symétries, sa polarité). Pour les centrosomes à plaque, les microtubules nucléés vers les chromosomes et ceux nucléés vers le cortex sont dans le même axe. Si les deux demi-fuseaux sont dans le même axe (orthomitose), l'ensemble a une symétrie axiale, qui convient à des cellules ayant la même symétrie (*S.pombe*). En revanche *S.cerevisiae* a aussi un 'avant' et un 'arrière' du fait de l'asymétrie conférée par sa division par bourgeonnement. En fait, il ne s'agit pas là de définir un nouvel axe, mais juste de polariser l'axe du fuseau : pour cela il suffit que les deux pôles ne soient pas équivalents. Or le mode de reproduction des SPBs n'est pas semi-conservatif, il y a donc une asymétrie dans la composition protéique (ce qui a récemment été exploité pour démontrer que c'est toujours

l'ancien SPB qui va dans la cellule fille, Pereira et al., 2001). De plus, contrairement à ce qui était admis jusqu'à présent (et qui est représenté sur la figure), il semble que le demi-pont ne se sépare pas en son milieu, mais qu'il est en fait entièrement récupéré par le centriole fils (J.Kilmartin, communication personnelle). Enfin, puisque le demi-pont n'entoure pas le SPB auquel il est associé, mais qu'il n'est présent que sur un secteur angulaire (le SPB est cylindrique), et comme on sait qu'il est capable dans certaines conditions d'ancrer des microtubules, on peut imaginer qu'il définisse lui-même un autre axe. Ainsi, les centrioles à plaques pourraient aussi définir plusieurs axes (on peut noter en passant que le fuseau lui-même peut être plus compliqué et qu'il existe des mitoses avec des fuseaux coudés, que l'on appelle les pleuromitoses). Néanmoins, comme on l'a déjà souligné, le fait que les plaques soient insérées dans la membrane nucléaire et leur forme même de plaque fournit une corrélation immédiate entre l'axe du fuseau et celui des microtubules cytoplasmiques, alors que cette corrélation est moins évidente à réaliser avec des centrioles (avec une boule, c'est déjà plus facile, donc on peut imaginer que les centrioles organisent une boule nucléatrice, avec un biais dû à leur orthogonalité). Dans les cellules de vertébré, de nombreuses images de microscopie électronique montrent qu'à chaque pôle un centriole est orthogonal à l'axe du fuseau (Vorobjev and Chentsov Yu, 1982). Même si ces images sont suggestives, elles n'expliquent pas comment ces orientations des centrioles peuvent avoir une influence sur l'organisation des microtubules cytoplasmiques.

Malgré la longueur de ce chapitre, j'aimerais ajouter que penser l'orthogonalité par rapport à la mitose, conduit à envisager la duplication du centrosome comme une phase d'assemblage des centrosomes mitotiques. En effet, il y a deux centrioles en G1 et on a vu que chacun de ces centrioles pouvait assembler un pôle. Dans ces conditions, pourquoi faut-il assembler deux nouveaux centrioles ? Lorsque la cellule décide d'entrer en phase S et de répliquer son ADN, il faut qu'elle se prépare aussi à la mitose qui va suivre. Or on a vu que les centrosomes

mitotiques sont très différents des centrosomes des cellules en phase G1 ou G0. Ainsi, la phase S correspond à un processus d'assemblage des deux centrosomes mitotiques à partir des deux centrioles du centrosome interphasique. Il est amusant que cette vue ait semblé naturelle pour le NAB, dont il a été proposé que la duplication ait lieu en mitose, simplement parce qu'on ne peut pas distinguer dans les plaques la partie nouvellement assemblée de l'ancienne. On a montré comment on pouvait envisager de comparer le NAB au centrosome centriolaire, et on peut aussi faire l'inverse, représenter schématiquement la duplication du centrosome centriolaire en ignorant la présence des centrioles. Cela a l'avantage de proposer un schéma unifié de la duplication, sans tenir compte des corpuscules centrosomiaux sur lesquels elle est fondée (voir la figure 41).

#### Quand commence la reproduction du centrosome ?

Pour qui regarde la figure 41 en détail, une deuxième singularité apparaît : en G1, le SPB de *S.cerevisiae* est déjà associé à une sorte de satellite ancré au bout du demi-pont, dont il a pu être récemment démontré qu'il est un précurseur du futur SPB. C'est une sorte d'amorce comportant déjà un certain nombre des protéines qui composent le cœur d'un SPB. En fait, ce type d'observation a aussi été rapporté pour des centrosomes centriolaires d'unicellulaires flagellés : un anneau d'un diamètre équivalent à celui du centriole et comportant neuf sous-unités est associé aux centrioles, au bout de fibres de centrine. Certains marqueurs moléculaires semblent même révéler la présence de pré-complexes associés aux centrioles dès la phase G2 (K.F.Lechtreck, communication personnelles). Toujours selon le même principe qui veut qu'une conservation entre centrosomes à plaque et centrosomes à centrioles révèle finalement un mécanisme universel, on pourrait s'attendre à observer quelque chose de similaire chez les vertébrés. La centrine a été très étudiée chez les vertébrés (on donnera plus

de détails plus loin) et il ne semble pas qu'elle forme des fibres aussi importantes que celles des flagellés ou des ciliés.

J'ai mené pendant ma thèse une étude utilisant des cellules humaines et murines exprimant de manière stable une centrine couplée à la GFP. Cette protéine se localise de la même manière que la protéine endogène révélée par des anticorps et je l'ai principalement utilisée comme un marqueur des centrioles. J'ai aussi observé le comportement des satellites de centrine. Il en existe de plusieurs tailles (la GFP permet une quantification précise) et ils sont très nombreux en S et G2. En revanche, il semble qu'il y ait le plus souvent en G1 uniquement deux satellites de centrine environ dix fois plus brillants que les autres et dix fois moins brillants que les centrioles. C'est à dire la gamme d'intensité qu'auront en début de phase S les pro-centrioles, à la différence près que ces satellites ne sont pas associés de manière permanente aux centrioles mais s'agitent chacun autour d'un des deux centriole (voir la figure 43). Ces résultats non publiés et qui ne seront pas développés dans le cadre de cette thèse sont très suggestifs. Ils évoquent la possibilité qu'il existe dès G1 des pré-complexes contenant de la centrine, mais pas de microtubules, associés aux centrioles et que l'évènement qui aurait lieu à la transition G1/S est en fait l'association de ces pré-complexes aux centrioles, provoquant la nucléation de la structure microtubulaire. La figure 43 M montre une séquence d'images tirées d'un film d'une cellule HeLA en G1. Le temps est indiqué en haut à gauche en minutes:secondes (le film de départ a été réalisé avec une image toutes les deux secondes). Le centriole parental et le satellite qui lui est associé sont en rouge, le centriole fils et son satellite en vert. Quand il y a plusieurs points rapprochés (aux temps 01:54 ou 03:30 par exemple), c'est que le centriole fils a bougé pendant le temps d'acquisition (300 ms).

## **- Conclusion**

En conclusion, on peut essayer de donner un schéma type de la reproduction des centrosomes.

On appellera ici corpuscule centrosomal un SPB ou un centriole.

Un pré-complexe associé à chaque corpuscule centrosomal par une fibre contenant probablement de la centrine s'assemble en G1. Ce pré-complexe donne naissance à un nouveau corpuscule centrosomal, qui s'assemble durant les phases S et G2 sous le contrôle de la kinase cdk2. Lorsque le fuseau s'assemble, il y a séparation des deux centrosomes. Quand le centrosome comporte deux corpuscules centrosomaux, il faut ajouter une étape en sortie de mitose au cours de laquelle il y a une modification du lien entre les deux corpuscules centrosomaux.

Enfin, une conclusion importante que l'on peut faire à l'issue de ce chapitre est l'existence très générale d'un lien entre pôles du fuseau et centrosome. Dans toutes les espèces, quelles que puissent être les autres fonctions attribuées au centrosome ou aux corpuscules centrosomaux (comme la nucléation des axonèmes), le centrosome se reproduit par un mécanisme de duplication étroitement couplé au cycle de division cellulaire dont l'intérêt immédiat est de fixer le nombre de pôles mitotiques à deux. Les autres fonctions que les centrosomes peuvent jouer à ces pôles sont plus liées à la géométrie particulière de la cellule et de sa mitose. Le rôle le plus immédiat est le contrôle de la position du fuseau, aussi bien chez les unicellulaires flagellés (le mutant *bld2* qui n'a plus de centriole a un fuseau mal dont la position est aléatoire, Ehler et al., 1995) que chez les levures (Adames and Cooper, 2000) ou chez les métazoaires (de Saint Phalle and Sullivan, 1998).

#### 4. Conservation moléculaire, conservation fonctionnelle

On va encore faire quelques comparaisons, pour cette fois essayer d'en tirer un schéma général de l'architecture du centrosome. Il existe principalement deux éléments centrosomiens particulièrement conservés chez les eucaryotes : le petit complexe associé à la  $\gamma$ -tubuline (le  $\gamma$ -TuSC) et la centrine.

##### - Le complexe de nucléation (ou de stabilisation des bouts moins)

Il y a deux points importants qui caractérisent ce complexe : d'une part il est soluble et possède en général un grand nombre de sites d'ancrage sur des protéines variées participant à diverses structures cellulaires, ce qui permet une modularité du système microtubulaire (par exemple chez *S.cerevisiae*, l'existence de microtubules cytoplasmiques et de microtubules nucléaires, Schiebel, 2000 ; ou chez les vertébrés, l'existence de microtubules centrosomiens ou golgiens, Chabin-Brion et al., 2001) ; d'autre part, son activité peut être régulée, ce qui ajoute une dimension à la plasticité du système. Les trois protéines qui constituent ce complexe peuvent être retrouvées dans à peu près toutes les espèces eucaryotes. La conservation de la  $\gamma$ -tubuline est importante (Stearns et al., 1991). Il faut néanmoins noter que deux espèces présentent des divergences inhabituelles : *S.cerevisiae* et *C.elegans* (pour une revue voir Oakley, 2000b). Il est difficile en l'état actuel des connaissances de spéculer sur l'origine de ces divergences dans des organismes aussi différents l'un de l'autre. Il serait sûrement intéressant de creuser la question et d'essayer de savoir ce qui a bien pu lever la contrainte qui pèse chez les autres organismes sur la conservation de la  $\gamma$ -tubuline. Il est à noter que chez *C.elegans*, une réduction quasiment complète de la quantité de  $\gamma$ -tubuline n'annule pas les capacités de nucléation du centrosome, même si l'aster semble perturbé (Strome et al., 2001).

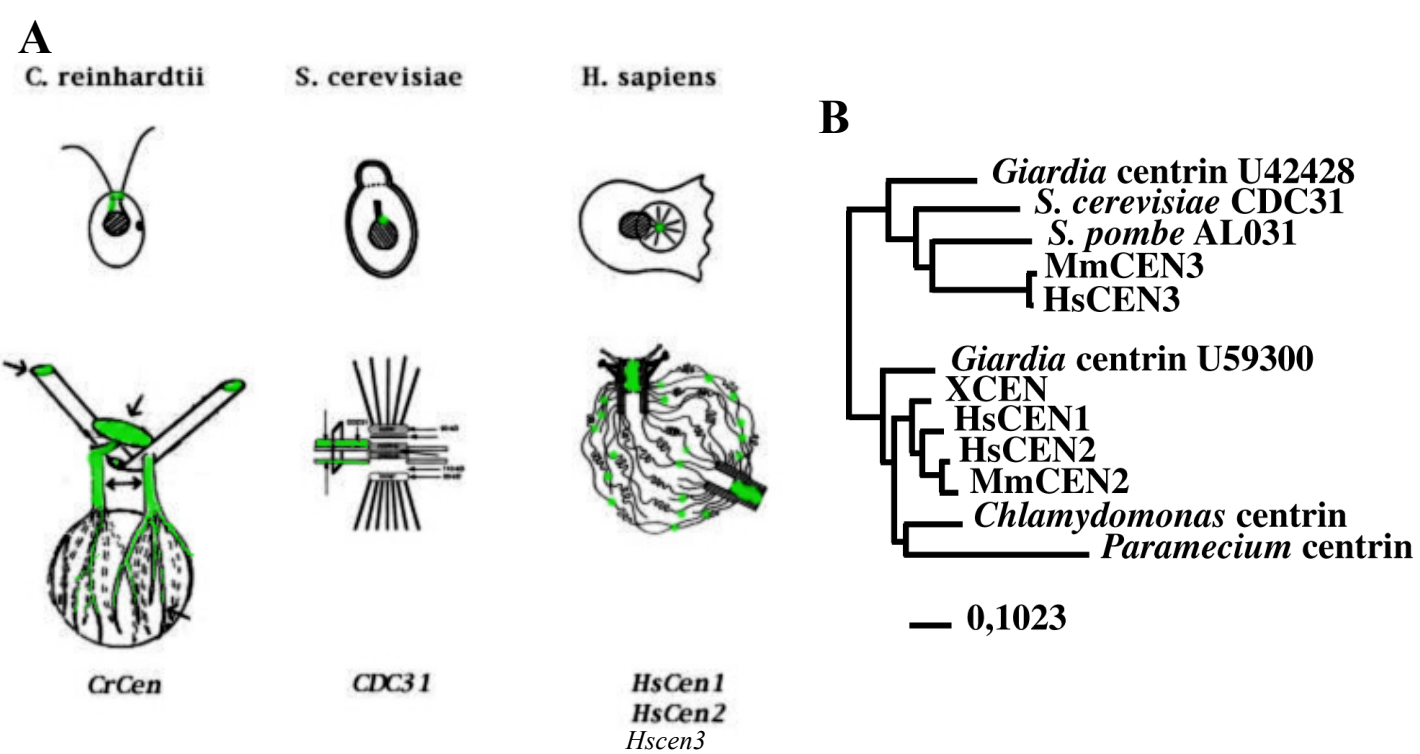
### - Le système centrine

Les centrines des divers eucaryotes forment une sous-famille bien distincte du groupe des protéines qui lient le calcium (voir la figure 42). Il y a des gènes de centrine identifiés dans quasiment toutes les grandes familles d'eucaryotes et ils sont très conservés (Schiebel and Bornens, 1995). Ces protéines sont caractérisées par la présence de quatre domaines à hélice-boucle-hélice capables de lier un ion calcium, nommées 'EF hands'. Comme les autres protéines liant le calcium, les centrines sont plutôt des petites protéines (environ 20 kD) ayant un point isoélectrique acide et un site de phosphorylation. Il peut exister plusieurs gènes de centrine dans une même espèce (au moins quatre formes humaines) dont les capacités de liaison au calcium ne sont pas identiques.

Le fonctionnement de base de ces protéines, qui a été bien démontré pour un certain nombre d'espèces, est un changement de conformation particulier consécutif à la liaison du calcium : la protéine se referme et adopte une forme plus compacte (Wiech et al., 1996). En effet, il semble que la centrine soit apparue par double duplication du domaine de liaison au calcium d'une protéine ancestrale (Moncrief et al., 1990), ce qui lui confère cette structure symétrique rétractable. Elle est de plus capable de former des oligomères (Wiech et al., 1996). Une protéine qui peut se compacter et former des oligomères évoque immédiatement une sorte de caoutchouc dont on pourrait faire varier la taille des monomères, et par suite la longueur (Baron and Salisbury, 1992). On pense donc à la possibilité de former des fibres élastiques qui pourraient se contracter en réponse à un changement de la concentration locale en calcium, propriété qui a été démontrée in vitro pour certaines centrines (Wiech et al., 1996).

En fait, la centrine s'est vue attribuer ce rôle d'assemblage de fibres contractiles dès son identification : elle a été identifiée dans les racines flagellaires striées contractiles dont elle est le composant majoritaire chez une algue verte tétraflagellée, *Tetraselmis striata* (Salisbury et





**Figure 42: La conservation moléculaire des centrines**

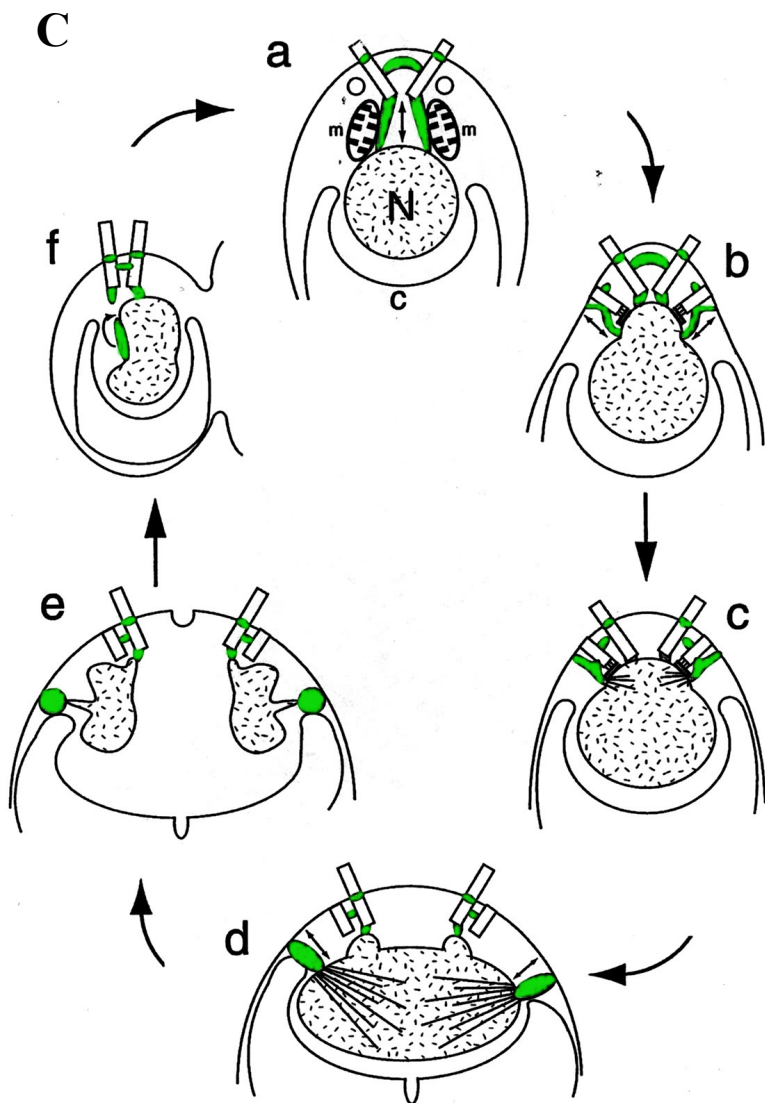
A: Localisation de protéines de la famille des centrines (en vert) dans différentes espèces, des algues unicellulaires aux humains, en passant par les levures, ce qui correspond à trois types différents de structures de type centrosomales (cinétosome, SPB, centrosome).

B: Un arbre phylogénétique des centrines.

A, B : D'après Middendorp et al. 2000) et la thèse de Sandrine Middendorp (1999).

C: Le comportement des centrioles et la localisation de la centrine au cours d'un cycle de division cellulaire de *Dunaliella bioculata* (une algue verte). Les centrioles fils se déplacent vers le noyau. Leur point d'association au noyau constituera un futur pôle contenant de la centrine. Il semble aussi qu'ils nucléent l'assemblage des fibres de centrine qui relie le noyau avec le cortex en mitose. Le lien entre les deux centrioles s'établit de manière complexe, ainsi que le lien du centriole au noyau.

D'après Grunow et Lechtreck ( soumis, 2001, communication personnelle, voir aussi Lechtreck et Grunow, 1999).



al., 1984). Elle a ensuite été identifiée dans de nombreux unicellulaires ciliés et flagellés et toujours localisée dans les fibres contractiles associées aux appareils flagellaires et plus précisément aux corps basaux. Ainsi, elle forme un réseau régulier couvrant la totalité de la surface interne du cortex de la paramécie (le réseau infra-ciliaire, Garreau de Loubresse et al., 1991). Sa fonction dans ce contexte semble claire : en se contractant, ces fibres peuvent faire varier l'orientation de la base de l'axonème et influencer sur son battement. Chez de nombreuses algues vertes, les axonèmes peuvent produire soit un battement ciliaire pour la nage vers l'avant, soit un battement de type flagellaire pour la nage vers l'arrière. Ce changement de battement est corrélé à une contraction d'une fibre contenant de la centrine et reliant les bout distaux des corps basaux : la fibre est contractée et les corps basaux parallèles pour le battement de type flagellaire alors qu'elle est relâchée pour la nage de type ciliaire (McFadden et al., 1987 ; Hayashi et al., 1998). Cette contraction se produit à la suite d'un changement de la concentration en calcium en réponse à un changement de la luminosité par exemple. Pour achever de se convaincre du rôle de la centrine dans l'assemblage de structures contractiles, on peut rappeler qu'une très proche cousine de la centrine, la spasmine du cilié vorticelle présente dans les spasmonèmes (Amos et al., 1975), structures contractiles, produit des mouvement extrêmement rapides (de l'ordre du millimètre par seconde).

L'abondance de ces fibres contractiles chez les protistes semble faire pendant à la présence très réduite de fibres contractiles acto-myosiques chez ces organismes. Elles pourraient aussi avoir un rôle de déformation du cortex cellulaire, habituellement attribué au système acto-myosique dans les cellules de type amiboïde. Le système acto-myosique peut lui aussi être régulé par le calcium, grâce à une autre protéine à calcium : la chaîne légère de la myosine (et la tropomyosine dans le muscle ; ces deux protéines font partie, comme la centrine de la famille des protéines de type calmoduline). De même, il est suspecté pour la centrine un rôle de régulation d'autres protéines, en particulier dans les axonèmes dans lesquels elle est

associé à un complexe contenant la dynéine. Elle semble se lier à la chaîne lourde du moteur et pourrait aussi avoir une affinité pour les microtubules (Le Dizet and Piperno, 1995). De plus, il a pu être montré qu'elle est nécessaire à l'assemblage du flagelle du spermatozoïde de la fougère *Marsilea* (Klink and Wolniak, 2001).

La deuxième centrine caractérisée fut celle de *S.cerevisiae*, cdc31p (Huang et al., 1988). Comme son nom l'indique (cdc pour cell division cycle), le gène codant cette protéine a été identifié lors du criblage des mutants de cycle de L.Hartwell. On sait maintenant qu'elle est nécessaire à la duplication du SPB, les mutants cdc 31 s'arrêtant en G2 suite à un défaut d'assemblage du fuseau dû à la présence d'un SPB unique. Plus précisément, la centrine de *S.cerevisiae* constitue le pont qui relie les deux SPBs, ce qui la rapproche fonctionnellement des centrines de protistes (famille dite de type caltractine). Cependant, chez les protistes, la centrine ne semble pas jouer de rôle dans l'assemblage des centrioles, mais plutôt dans leur répartition lors de la mitose : le mutant vfl2 de *C.reinhardtii* a des centrioles qui ne sont plus reliés entre eux ni au fuseau mitotique et peuvent se retrouver à trois voire quatre dans une des cellules filles (Wright et al., 1983). Il a été observé que les fibres contenant de la centrine et reliant les corps basaux au noyau (NBBC pour nucleus-basal-body connector) se contractent à plusieurs reprises pendant la mitose, et en particulier en prophase et en anaphase, les corps basaux se rapprochant transitoirement des pôles où ils semblent déposer de la centrine, comme pour mettre en place un nouveau lien avec le noyau (Salisbury et al., 1988, et K.F. Lechtrek communication personnelle).

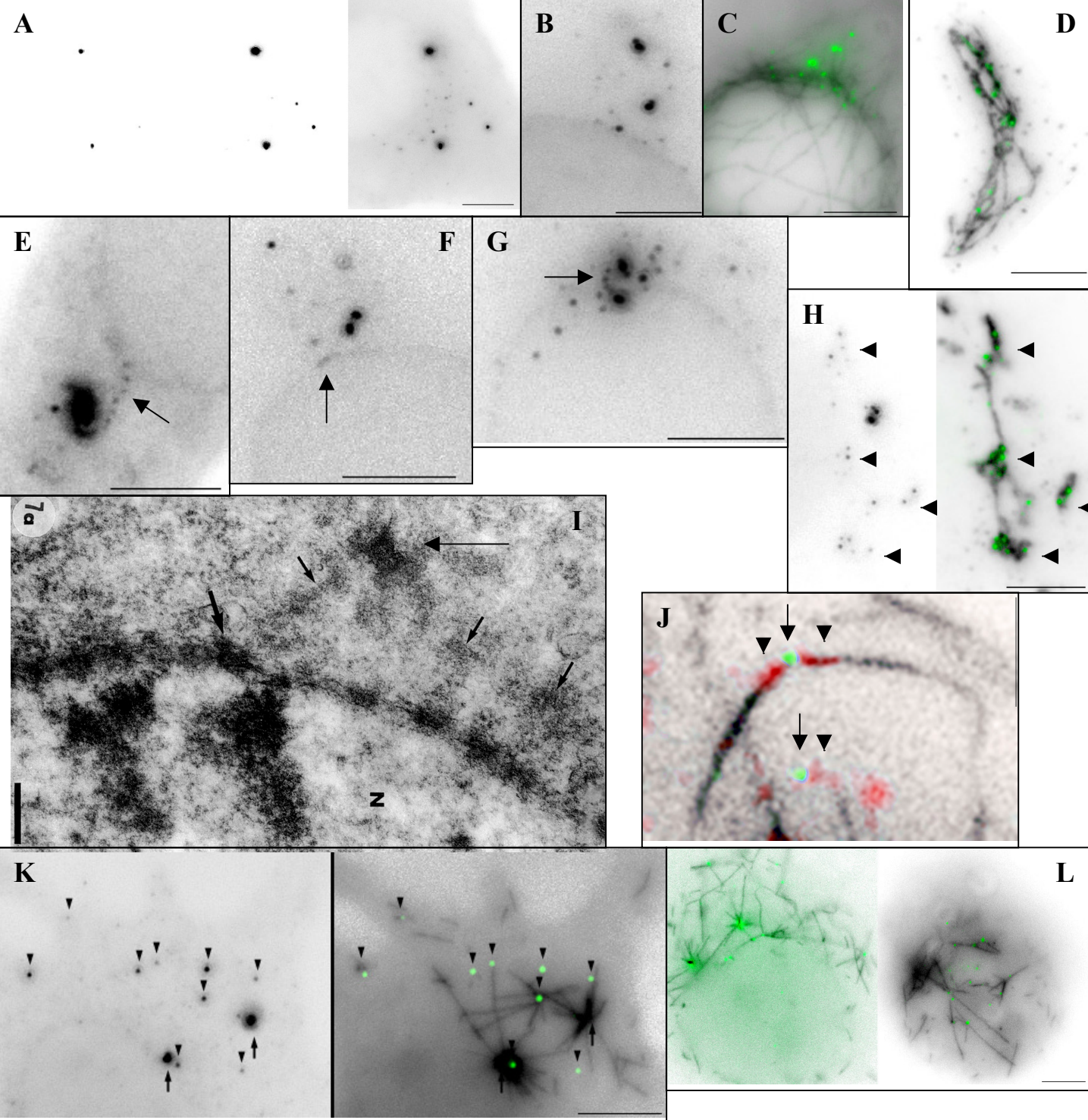
Enfin, la centrine est présente dans la lumière des cylindres centriolaires, au niveau du bout distal, et cela dans toutes les espèces possédant des centrioles (Paoletti et al., 1996). Sa présence dans le centriole n'est pas comprise.

D'une manière générale, dans tous les systèmes où son rôle est à peu près clair, la centrine a une fonction de cohésion du centrosome (cohésion des corpuscules centrosomaux) et

d'ancrage du centrosome au noyau. Elle fait partie de fibres qui peuvent se contracter en réponse à des signaux calciques dans de nombreuses espèces. On peut imaginer les rôles que les différents gènes de cette protéine peuvent jouer chez les vertébrés. Les vertébrés possèdent des gènes de centrine du type caltractine (protéines contractiles et de cohésion chez les protistes) et un gène de centrine du type cdc31 (la centrine 3). Cette protéine serait plutôt impliqué dans la duplication (Middendorp et al., 2000), mais peut-être toujours à travers un rôle de lien (on peut imaginer que le pré-complexe dont on a parlé plus haut, pour être activé et donner naissance à un nouveau centriole doit s'associer à une structure contenant de la centrine 3, ce qui est le cas chez *S.cerevisiae* où cdc31 recrute la kinase Mps1 qui régule l'assemblage de Spc 42).

A l'aide des lignées exprimant la centrine GFP, j'ai pu confirmer l'existence déjà supposée grâce à des anticorps de tout un réseau de centrine qui entoure le centrosome et le noyau, avec des points d'accumulation associés à des microtubules stables (résultats non publiés, voir la figure 43), rappelant une sorte de réseau infraciliaire décilié, internalisé et désordonné.

La figure 43 montre plusieurs images observées dans les lignées exprimant la centrine-GFP, elles sont évidemment à prendre avec prudence, puisqu'il s'agit d'une surexpression. Elles sont toutes des projections maximales réalisées à partir de séries de photos prises tous les 0,3µm le long de l'axe vertical. En A, on voit une image d'une cellule en G1 travaillée de manière à ne voir que les centrioles (à gauche), ou bien les centrioles et les deux satellites les plus intenses, et enfin, tous les satellites. Les centrioles sont de trois à cinq fois plus lumineux que les satellites les plus lumineux qui sont eux-même de deux à quatre fois plus lumineux que les autres satellites. Ces satellites sont plus abondant en S et en G2. Dans l'image B, on voit qu'ils entourent les centrioles (les deux points noirs plus gros) et semblent associés au bord du noyau. En C on voit la centrine en vert et les microtubules en noir. On peut remarquer que les satellites sont particulièrement concentrés dans un région proche du noyau, riche en



**Figure 43: Le système centrine**

Cette figure regroupe des images

commentées dans le texte (à la fin de la partie ‘quand commence la duplication?’ et à la fin de la partie sur le système centrine). Barres: 5  $\mu\text{m}$ , sauf J: 2  $\mu\text{m}$  et M: 4  $\mu\text{m}$ . Ce sont des résultats de M. Piel et al. non publiés sauf l’image I qui est tirée de Debec et al. (1999). C’est une image d’embryon de drosophile. La longue flèche indique un centriole court et les autres flèches des masses denses qui semblent relier le centriole à la membrane nucléaire et en particulier à des pores nucléaires. La barre est de 0,2  $\mu\text{m}$ .

microtubules stables (la cellule a été traitée pendant 10 minutes avec 1  $\mu$ M de Nocodazole, avant la fixation). En D, on voit que cette région correspond aussi à la région où se trouve l'appareil de Golgi (en noir). En E, on voit clairement un chapelet de satellites de centrine qui relie le centrosome (la grosse boule noire, qui a une taille anormale, car le signal a été saturé pour mettre en évidence les satellites). En F, on voit bien deux satellites associés à la membrane nucléaire (la membrane nucléaire est marquée très finement et de manière homogène par la centrine). En G, c'est un lien entre les centrioles qui semble formé par un chapelet de satellites. En H, on peut voir la collocalisation de petits groupes de satellites avec des fragments de golgi formés après un court traitement au nocodazole (comme en C). Les centrosomes ont été supprimés dans l'image en couleur (le golgi est en noir dans cette image). L'image I montre des satellites dans l'embryon de drosophile, qui semblent eux aussi former des chapelets qui relient le centrosome au noyau et plus précisément à des pores nucléaires. Il a par ailleurs été souvent observé en microscopie électronique la présence de satellites autour du centrosome, associés à des microtubules et à des microfilaments. L'image J montre un satellite (en vert et flêché) associé à deux microtubules stables (têtes de flèche). Un marquage d'une protéine associée au bout moins des microtubules (AKAP 450) en rouge, montre que la centrine est associée au bout moins des microtubules. En K, on voit encore l'association de satellites avec des microtubules mais cette fois lors d'une repolmérisation à la suite d'une dépolymérisation complète. Des petits microtubules partent des satellites, mais aussi de plus long et il y a même une sorte d'aster associé à l'un des satellites. (les grosses taches noires sont les asters associés aux centrosomes qui sont saturés pour révéler les petits microtubules associés aux satellites, les centrosomes ont été supprimés sur l'image en couleur). En L, deux plans différents sont montrés (le fond de la cellule à gauche et le dessus du noyau à droite). Il s'agit encore d'une expérience de repolymérisation. On voit qu'un certains nombre de satellites associés au noyau sont aussi associés à des microtubules en train de polymériser.



La centrine semble donc, dans les cellules de mammifère, définir une zone entourant le centrosome, qui s'étend jusqu'à la membrane nucléaire et à l'appareil de Golgi, c'est à dire une localisation très similaire à celle de l'AKAP 450. Elle est en outre associée au bout moins de microtubules stables après un traitement court au nocodazole, et à des amorces de microtubules après une courte repolymérisation.

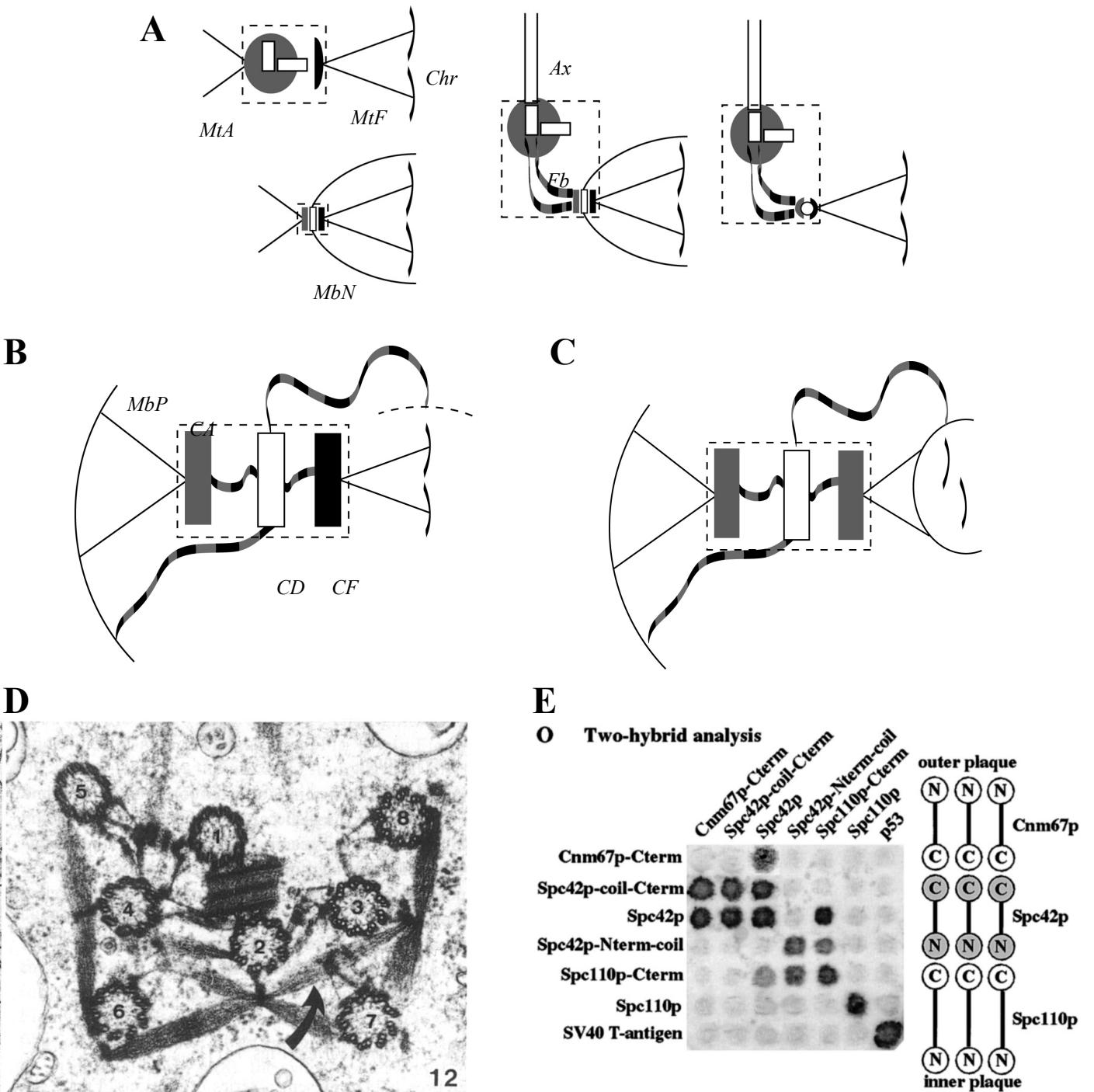
Il faut noter ici que le nématode *C.elegans* ne semble pas posséder de gène de centrine. On peut rappeler qu'il a des centrioles particuliers et ne possède pas d'axonème motile et que son spermatozoïde n'a ni flagelle ni enveloppe nucléaire. Il a aussi un gène de  $\gamma$ -tubuline exceptionnellement divergent.

#### **- Le déplacement du noyau**

On a décrit un système cohésif relié au noyau et capable de nucléer et d'ancrer ou de relâcher des microtubules. Ce lien au noyau a des conséquences fonctionnelles multiples et il semble exister deux autres classes de protéines reliées à cette fonction et conservées parmi les eucaryotes : les gènes impliqués dans le déplacement du noyau (la protéine LIS 1 pour la signalisation, mNudE qui recrute LIS 1 au centrosome, NUDEL qui la recrute à la membrane plasmique dans des complexes contenant la dynéine, qu'elle active, pour une revue voir Wynshaw-Boris and Gambello, 2001). Cette voie implique probablement les protéines, elles aussi conservées, associées aux bouts plus des microtubules, ainsi que la signalisation spatiale associée au centrosome (qui semble signaler la proximité entre le centrosome et la membrane plasmique, voir discussion du papier 2).

On peut noter que les différentes dénominations des corpuscules polaires persistant en interphase ou non, qui ont fini par désigner l'organite correspondant au centrosome dans des espèce particulière, contiennent souvent le rappel d'une association du corpuscule au noyau : NAB pour 'nuclear associated body' (dans Dictyostelium, Roos, 1975), ou NAO pour nuclear





**Figure 44: Schémas génériques du centrosome interphasique et du centrosome mitotique**

A: Quatre types de pôles, avec centrioles au pôle, avec plaque au pôle, avec plaque ou boule associés à des centrioles qui sont restés au cortex à la base d'un axonème (*Ax*). Il peut aussi y avoir des boules seules.

B: Le centrosome mitotique. Il est ancré au cortex (*MbP*) par des microtubules (*MtA*) ou par des fibres (*Fb*), et aux chromosomes (*Chr*). Les pointillés représentent la membrane nucléaire (*MbN*) d'une endomitose. Il comporte trois parties: un corpuscule capable de se dupliquer (*CD*), un complexe chargé de l'ancrage des microtubules du fuseau (*CF*) et un complexe chargé de l'ancrage des microtubules astraux (*CA*).

C: Le centrosome interphasique. Il n'a pas la partie chargée des microtubules du fuseau et est ancré au noyau (par des microtubules ou des fibres).

D: Une image illustrant la cohésion entre les centrioles de *Pyraminis octopus* (Moestrup et Hori, 1989)

E: La structure moléculaire du centrosome, un enchaînement de protéines à domaines coiled-coil ancrées par leur extrémité C-terminale sur une structure centrale (ici SPC 42, chez *S.cerevisiae*). D'après Adams et Kilmartin (1999).

associated organel' (Girbardt and Hadrich, 1975). C'est cette dénomination que choisi Heath dans sa revue (Heath, 1980) et il est dommage que le terme MTOC ait souvent été préféré.

### **- Les sous-parties fonctionnelles du centrosome**

En conclusion, on peut essayer de donner une sorte de schéma de construction des centrosomes, qui reflète leur fonctionnement (voir la figure 44). Il y a tout d'abord un ou plusieurs corpuscules qui sont tenus ensemble par des fibres contractiles. Cet ensemble est relié au noyau en interphase (inséré dans la membrane, ou tenu par des fibres) et aux chromosomes en mitose. Il est aussi associé au cortex cellulaire (par des fibres ou des microtubules).

Ce 'corpuscule central' est donc central dans le sens où il se situe entre le noyau, ou les chromosomes, et le cortex cellulaire, comme un anneau. Mais cet organite complexe n'est pas un simple anneau : il contient quantité de protéines aux propriétés mécaniques intéressantes (les centrines et les protéines à domaine 'coiled-coil') régulées par de multiples signaux biochimiques. Je proposerais de le voir comme un dynamomètre sophistiqué, qui pourrait intégrer les tensions qui s'exercent sur lui mais aussi des signaux biochimiques cytoplasmiques (l'AMPc par la kinase A associée à l'AKAP 450, le calcium par la calmoduline associée à l'AKAP 450 ou par les centrines) pour décider de retenir ou de lâcher les microtubules qui le maintiennent sous tension afin de coupler la position de l'élément génétique à des signaux extérieurs, que ce soit dans la migration, la division ou la différenciation cellulaire. Cet organite pourrait de plus, grâce aux activités enzymatiques qui lui sont associées, signaler sa position par rapport à la membrane plasmique, afin de déclencher une nouvelle phase du processus quand l'élément génétique est arrivé à bon port (voir la discussion du papier 2 et la conclusion générale du mémoire où ces idées sont développées).

## 5. Conclusion

### - L'évolution des contraintes évolutives

Il est vain de chercher à définir une fonction commune à tous les centrosomes. Les fonctions s'ajoutent les unes aux autres et imposent des contraintes sur les structures auxquelles elles sont associées, car elles les rendent essentielles. Par exemple, on ne peut pas penser que les centrioles ne sont que des passagers en mitose destinés à fabriquer des flagelles plus tard, car le génome des vertébré contient un programme d'assemblage *de novo* des centrioles et beaucoup d'espèces ne les assemblent que quand elles en ont besoin. Il n'y a donc pas de nécessité à conserver une copie du centriole dans la cellule. Il y a donc, chez les vertébrés, d'autres fonctions qui se sont attachées aux centrioles et qui les rendent nécessaires même quand il n'y a pas d'axonème à assembler, comme par exemple la détermination du nombre de pôles (travail soumis de Miguel Abal sur l'effet du désassemblage des centrioles par l'anticorps GT 335). L'interprétation selon laquelle la fréquence d'assemblage d'axonèmes (Heath, 1980) discriminerait entre une stratégie d'assemblage *de novo* et une stratégie de conservation et d'équipartition n'est pas convaincante. C'est en fait un exemple de plus d'interprétation purement causale, du type du paradigme génétique dans sa version courte, dont on sait aujourd'hui qu'elles ne sont jamais valables dans le monde vivant (ou ailleurs). Donc la position polaire des corpuscules fusoriaux permet leur équipartition, mais leur présence a elle-même un rôle dans le bon déroulement de la division cellulaire, de même que les complexes associés aux kinétochores ne servent pas seulement à ancrer les chromosomes, mais aussi à contrôler le bon assemblage du fuseau, à travers le spindle assembly checkpoint.

## **- La modularité du centrosome**

Au cours de l'Evolution, comme c'est souvent le cas dans les processus d'ingénierie, on a toujours construit à partir de ce qui existait déjà. Il y a donc empilement de fonctions et, si le centrosome des vertébrés paraît si complexe, c'est probablement suite à l'accumulation de fonctions en ce lieu privilégié par l'organisation des microtubules. Les cas où ces attributs se séparent - dans les cellules différenciées ou dans d'autres organismes (comme *Physarum polycephalum*) - le démontre, mettant en évidence une stratégie commune aux organismes vivants et aux ingénieurs : la modularité (en fait la modularité est un moyen de faire évoluer un système, malgré des contraintes de continuité). La modularité est une notion essentielle pour comprendre le centrosome. Le centrosome est une collection de modules qui ont des fonctions variées. Comprendre la fonction du centrosome, c'est comprendre le rôle que peut avoir au niveau cellulaire, le rassemblement de ces modules dans un même organite. Ce n'est pas seulement comprendre le fonctionnement de ces modules, même si c'est une étape nécessaire.

Pour comprendre le centrosome, il est aussi important de bien distinguer le centrosome interphasique et le centrosome mitotique. Le centrosome mitotique est le pôle du fuseau. Il est modulaire et comporte un certain nombre de parties : la partie qui s'associe aux microtubules du fuseau, la partie qui s'associe au cortex et un lien élastique entre ces parties. Ces trois parties peuvent être plus ou moins distinctes selon les cas. Le centrosome interphasique comporte une partie chargée des microtubules cytoplasmiques (les complexes de nucléation et d'ancrage péricentriolaires), une partie chargée du lien avec l'appareil moteur quand il existe (par exemple, dans les centrosomes à centrioles, le centriole parental ancre les microtubules par ses bras subdistaux et peut nucléer un axonème, il s'ancre alors au cortex par ses bras distaux) et un lien au noyau. Encore une fois, ces parties peuvent être disjointes.

## - Petite histoire sur l'origine des eucaryotes

*Socrate, dans le Phédon de Platon, se trouvant à court d'argument – et à court de temps puisqu'il va mourir – pour justifier l'immortalité de l'âme face à des Pythagoriciens difficiles à convaincre, raconte l'histoire imaginaire de la course des âmes*

Puisque toute certitude nous est à jamais interdite en la matière, on peut imaginer une petite histoire des eucaryotes dont le seul intérêt est d'imager la conception qu'on a pu se faire du centrosome au cours de ces quelques pages de réflexions sur la phylogénie – tous les mystères de la phylogénèse ne seront donc pas révélés, mais seulement ceux ayant trait au centrosome.

J'imagine l'eucaryote primitif comme un grand plasmode infesté de bactéries dont certaines se spécialiseront dans la production d'énergie (les mitochondries) et d'autres dans le stockage et l'exploitation du matériel génétique (les noyaux), chacune se reproduisant individuellement. Le plasmode lui-même se fragmenterait de temps en temps, peut être simplement mécaniquement à cause de sa taille trop grande, donnant naissance à d'autres plasmodes. Dans ces conditions, on peut imaginer que plusieurs stratégies soient poursuivies, avec cette contrainte : il faut que les bouts de plasmode contiennent tous de l'information génétique et de quoi produire de l'énergie.

La production d'énergie resterait décentralisée dans de petites unités qui se répartiraient uniformément, alors que l'information génétique serait centralisée. Il faut alors trouver un mode de division qui permette d'assurer que chaque fragment de plasmode contienne un élément génétique. Dans le même temps, la dissémination apportant un avantage certain, il faut améliorer les mécanismes de fission du morceau de plasmode, pour que cela se produise plus souvent. Il faudra donc lier la mitose (la division de l'élément génétique) au processus de fission. Enfin, il faut aussi se préoccuper du fragment de plasmode, c'est à dire lui fournir un

moyen de propulsion pour améliorer la dissémination, assorti d'une régulation (il n'existe pas d'organisme doué de motilité et se déplaçant purement au hasard, il y a toujours un tactisme).

Donc, sous la pression de sélection associée à la dissémination et à la multiplication, le plasmode a du développer conjointement un moyen de former des fragments individualisés, un moyen de lier la mitose des éléments génétique à l'excision des fragments et un moyen d'assurer la motilité des fragment. Enfin il a du ajouter à tous ces processus des régulations permettant de prendre en compte les conditions environnementales.

Les protéines capables de former des polymères qui servaient déjà à couper la cellule procaryote (FtsZ, Erickson, 1995) ont été adaptées à l'excision de fragments de plasmode (l'actine du sillon de division), à la fabrication d'un appareil mitotique (les microtubules du fuseau), à la fabrication d'un appareil moteur (les microtubules du flagelle) et à la collection d'informations périphériques (les microtubules interphasiques et l'organisation radiale de la cellule).

Il restait à relier tout ça, c'est à dire à relier l'élément génétique (la mémoire) à la fois à l'appareil de fission et à l'appareil moteur. Un moyen simple est d'associer physiquement, c'est à dire de réunir en un même complexe cohésif, les éléments importants pour la réalisation des divers mécanismes qu'on veut relier.

Voilà présentée la genèse imaginaire d'un corpuscule modulaire dont la fonction essentielle est l'intégration au sens de l'intégrité, c'est à dire de tenir ensemble et cela dans une logique d'individuation – l'individuation étant une condition à la dissémination et à la multiplication et donc à la survie. Il reste à faire de ce corpuscule le nœud de l'intégration des signaux extérieurs en le dotant d'un système de collection de l'information (l'ancrage des bouts moins des microtubules) pour asservir les mécanismes qu'il relie à des déterminants extérieurs (ce qui est toujours important, mais devient primordial chez un être pluricellulaire dont toutes les cellules sont individualisées).

Passons en revue les modules du centrosome : les centrioles sont associés à la base des axonèmes - c'est à dire l'élément moteur primitif - dont ils dirigent l'assemblage ; les modules de nucléation et d'ancrage des microtubules sont associés aux centrioles, ce qui les relie au fuseau mitotique et au cortex (en particulier à la zone de fission, qui contient des microtubules) ; enfin les centrioles sont pris dans un système de fibres qui elles aussi les relie au cortex et à l'élément génétique.

Ce doublement des liens, par des microtubules et par des fibres élastiques représente peut-être simplement une contrainte mécanique : les microtubules transmettent les forces, ils se doivent de posséder une certaine rigidité et une résistance à la traction, alors que les fibres élastiques forment les jonctions entre les éléments rigides qui transmettent les forces et l'élément à déplacer, jonctions que l'on retrouve aussi à l'échelle de l'organisme vertébré, dans l'interaction squelette/muscle (les tendons).

On peut ensuite imaginer toutes les évolutions possibles d'un tel système : l'invention d'un nouveau mode de propulsion lié à l'élément qui a servi depuis le départ à déformer le cortex, l'actine (le pas n'est pas grand à faire pour que la déformation qui sert à réaliser une excision serve plutôt à un déplacement). Ce mode de propulsion ne nécessitant plus la présence des centrioles, le corpuscule intégrateur peut alors adopter une autre structure (comme chez *D.discoïdeum*). Il peut y avoir aussi abandon total ou partiel de la motilité (beaucoup de plantes et d'algues, si elles ne sont pas elles-même motiles, possèdent des gamètes ou des spores flagellés) et adoption de stratégies différentes de dissémination, comme un retour à la simple diffusion, favorisée dans des milieux peu visqueux comme l'air (milieu où vivent les champignons qui ont abandonné toute motilité et les plantes à graine de pollen siphonogames, il faut noter qu'en plus ces organismes dépendent souvent d'autres organismes, mitoles cette fois, comme les oiseaux, pour leur dissémination). Enfin, l'invention de nouveaux modes de

division (avec des parois, c'est à dire un référent externe et non plus interne) qui rend lui aussi caduque l'utilisation d'un corpuscule individualisé du noyau.

Certains auteurs (comme J.P.Mignot dans Mignot, 1996a) proposent que les centrosomes primitifs, comme c'est le cas chez certaines algues flagellées qui réalisent une endomitose, aient été constitués de plaques insérées dans le noyau et de centrioles reliés aux flagelles, ces deux classes de corpuscules étant reliées entre elles par des fibres. Les organismes ayant perdu leurs flagelles auraient vu leurs centrioles régresser et les fonctions auparavant réparties sur les deux organites rassemblées sur la plaque. Symétriquement, les organismes ayant évolué vers une exomitose et conservant des flagelles auraient vu les fonction des plaques s'associer plus ou moins étroitement aux centrioles.

Il y a certainement encore beaucoup à tirer de comparaisons entre espèces et c'est une gymnastique que s'imposent en permanence les biologistes. Il faudrait aussi ajouter, dans le cas du centrosome, une comparaison entre types cellulaires au sein d'un organisme. Cette comparaison met bien en lumière la modularité du centrosome et son lien étroit avec la géométrie cellulaire.

Je n'ai pas parlé de l'idée d'origine endosymbiotique des centrioles qui, bien qu'évoquée au même titre que pour les autres organites (Chapman et al., 2000), dont le noyau, est beaucoup moins convaincante, surtout parce que sa structure est clairement lié à celle de l'axonème dont l'origine endosymbiotique n'aurait pas beaucoup de sens (discuté dans Wheatley, *The Centrosome*, 1982). On pourrait imaginer que le flagelle bactérien soit à l'origine du flagelle eucaryote (en effet certaines cellules eucaryotes vivent en symbiose avec des bactéries qui servent à leur propulsion, Tamm, 1982), mais la flagelline qui compose le flagelle bactérien n'a rien à voir avec la tubuline et le principe de fonctionnement de ses deux flagelles sont



radicalement différents (glissement d'un microtubule par rapport à un autre pour le flagelle eucaryote et rotation entraînée par un moteur à la base du flagelle chez les procaryotes, voir la figure du papier Mouvement cellulaire donné en annexe). Ce serait pourtant une hypothèse attirante, la bactérie à la base du flagelle aurait peu à peu perdu son ADN et aurait donné le centriole, combinaison du petit rotor bactérien, de l'usine d'assemblage du flagelle et du complexe chimiotactique (le 'nez') de la bactérie (d'autant qu'il est supposé que le doublet central du flagelle eucaryote tourne sur lui-même, à la manière du flagelle bactérien).

Enfin, pour conclure cette parenthèse phylogénétique, je voudrais faire une remarque qui paraîtra une trivialité à certains, mais dont j'aimerais personnellement me rappeler : le vivant aurait pu être différent. Je veux dire par là que le mécanisme d'ingénierie qu'est l'Evolution n'a pas consisté à choisir régulièrement la plus adaptée entre toutes les possibilités, mais à faire évoluer ce qui existait. Le Vivant est profondément asservi au principe de réalité, il est réformateur par nécessité (il ne peut pas y avoir de discontinuité). L'être humain a cet avantage de pouvoir réellement faire du neuf, de pouvoir faire des 'révolutions', car il peut envisager les solutions avant de les réaliser, même si la plupart du temps, les ingénieurs sont soumis aux mêmes contraintes de continuité que le Vivant, imposées par la nécessité de survie économique. Ce n'est pas parce que théoriquement, il est possible d'imaginer un mécanisme simple qui suffit à réaliser ceci ou cela que le Vivant aura nécessairement développé cette solution minimale. Attribuer cette capacité au Vivant, c'est faire preuve d'anthropocentrisme.

Ce que je veux dire, c'est que, si le centrosome a quelque importance, même dans des cellules amiboïdes qui ont développé un appareil moteur (le système actine-myosine) qui ne nécessite pas forcément un asservissement par un système centralisé, c'est peut-être parce que ces cellules amiboïdes ont toutes un ancêtre flagellé et que certaines fonctions essentielles se sont associées, dans certaines espèces, à l'organite qui originellement servait uniquement à produire des axonèmes. On peut voir dans le spermatozoïde de nématode ainsi que dans la

forme amiboïde de *Naegleria*, une forme de motilité débarrassée du centrosome – en fait ce spermatozoïde est plutôt un transporteur de gamète, comme une sorte de graine de pollen siphonogame inversée, car le noyau et le centrosome sont pris, à l'intérieur du spermatozoïde, dans une coque, le système moteur, unique en son genre, étant complètement extérieur.

J'aimerais préciser à ce stade que je ne m'attribue en aucune manière les idées que j'ai exposées dans toute cette introduction. On pourra toujours les retrouver sous une forme ou sous une autre dans divers publications, et elles sont l'objet de nombreuses discussions entre les biologistes qui s'intéressent au centrosome. J'ai surtout essayé de bien séparer ce qui a trait à des réflexion d'ordre phylogénétique du reste, car ces réflexion, si elles sont une source permanente d'inspiration, doivent être considérées avec prudence. Trop souvent les articles traitant du centrosome mêlent sans précaution des argument tirés d'organismes les plus variés, sans tenir compte de leurs spécificités.



## **CENTROSOME ET MOUVEMENT CELLULAIRE**

# **I. INTRODUCTION :**

## **1. Généralités sur le mouvement cellulaire**

### **- Types de mouvements**

On pourra se reporter, pour une présentation très générale, au texte 'Mouvements cellulaires,' en annexe, et pour un ouvrage de référence, au 'Cell Movements' de D. Bray (seconde édition, Editions Garland, 2001).

Mis à part quelques types de mouvement difficiles à classer, on peut dire qu'il existe deux grands types de mouvements : la nage et le ramper, c'est à dire un mouvement prenant appui sur un milieu liquide ou sur une surface solide. Un principe physique primordial à l'échelle des cellules nous est peu familiers : la viscosité. Les stratégies de mouvement sont toutes des stratégies de mouvement en milieu visqueux, c'est à dire sans inertie (le nombre de Reynolds est très petit par rapport à 1). La nage est basée chez les eucaryotes sur l'utilisation d'un ou de plusieurs flagelles dont le principe de fonctionnement se rapproche de celui du corps des reptiles : la force est produite tout au long du flagelle et le déplacement est du à l'appui sur le milieu visqueux (pour un modèle du battement axonémal voir la thèse de S. Camalet, 2001). Les ondes qui se propagent le long du flagelle donnent principalement lieu à deux types de battements : un battement symétrique ou battement flagellaire et un battement asymétrique ou battement ciliaire. Certaines structures voisines des flagelles peuvent être utilisées pour produire des mouvements qui ressemblent plus au déplacement des mille-pattes. Des cellules comportant des milliers de cils, comme les paramécies, peuvent parcourir jusqu'à un millimètre en quelques secondes (mais elles sont grandes, parfois plus de cent microns de long).

Le ramper est aussi appelé mouvement amiboïde et consiste en une sorte de gagne terrain : la cellule étend devant elle des projections de son cytoplasme qu'elle ancre au substrat et qui peuvent avoir diverses formes aux noms évocateurs (filopodes, lamellipodes). Suivant les

types de cellule, la rétraction de l'arrière de la cellule joue un rôle plus ou moins important. Le rôle potentiel des ondes de surface est mal évalué, mais ces ondes pourraient être importantes. Ces cellules, qui se déplacent à des distances micrométriques d'une surface solide ou dans des gels, le font dans un milieu encore plus visqueux que les cellules qui nagent, ce qui donne en général des mouvements beaucoup plus lents. *A. proteus*, qui peut faire plusieurs centaines de microns de diamètre se déplace extrêmement lentement à l'aide de larges extension appelées pseudopodes qui peuvent mettre plusieurs minutes à s'allonger et à produire un mouvement significatif. Un peu plus rapides, certaines cellules du corps spécialisées dans la réponse immunitaire (les neutrophiles) peuvent parcourir jusqu'à vingt fois leur diamètre (une dizaine de micron) en une heure.

La plupart des types cellulaires des organismes métazoaires sont capables de locomotion, même si dans les tissus adultes ils ne se déplacent habituellement pas. Leurs mouvements de ramper bien que tous regroupés sous le nom de mouvement amiboïde peuvent être très variés : certaines cellules très rapides (les kératinocytes des poissons par exemple) ont un seul et très large lamellipode qui leur donne une forme hémisphérique. Le mouvement de leur membrane plasmique les fait ressembler à un rouleau compresseur. Certaines cellules plus grandes et capables de se diriger rapidement vers des bactéries ou des cellules mortes pour les éliminer (les polymorphonucléaires) forment un long pseudopode à la suite duquel le corps cellulaire semble entraîné comme un ballot. Les fibroblastes ont plutôt tendance à développer plusieurs lamellipodes, l'un d'eux entraînant le corps cellulaire pendant que les autres sont rétractés. La taille des cellules influe évidemment sur leur mode de déplacement : une petite amibe comme *Dictyostelium* développera en général deux pseudopodes, alors qu'un fibroblaste de mammifère peut en développer de plus nombreux.

Il est évident qu'en milieu naturel de même que dans les conditions de culture en laboratoire (et parfois sans qu'on puisse l'estimer), les cellules se déplacent en réponse à des stimuli

variés et sont doués de tactismes. La chimiotactisme est un tactisme très répandu, car il consiste à se diriger selon les gradients de molécules particulières - un équivalent de l'odorat - ce qui est une bonne manière de trouver de la nourriture. La taille des cellules eucaryotes leur permet de mesurer les gradients d'un côté à l'autre de leur corps, par comparaison des concentrations locales, alors que les organismes plus petits comme la plupart des bactéries doivent mesurer les variations de concentration au cours de leur déplacement. Les cellules eucaryotes peuvent adopter plusieurs stratégies : celle des amibes ou des fibroblastes semble consister à s'allonger dans plusieurs directions et à choisir celle qui est la meilleur, peut-être en comparant les concentrations au niveau de chaque pseudopode. Les polymorphonucléaires commencent par s'étendre dans toutes les directions, formant une sorte de disque, puis ils développent un unique pseudopode dans la bonne direction. Le kértatinocyte quant à lui a en permanence un pseudopode très développé, plus grand que son corps cellulaire, qu'il réoriente en effectuant des 'virages sur l'aile' : un côté du lamellipode ralentit tandis que l'autre continue à avancer. Dans tous les cas, les cellules s'étendent pour créer des points éloignés et mieux comparer les concentrations afin de distinguer la direction des gradients. On peut remarquer que ces différentes stratégies existent aussi au niveau des organismes pluricellulaires : un mammifère tourne la tête pour détecter la direction dans laquelle l'odeur est la plus forte, tandis que les requins-marteau ont choisi d'écarter considérablement leurs narines.

Chez ce poisson, le mécanisme de comparaison des concentrations passe par une intégration des influx nerveux au niveau du cerveau. En revanche, pour ce qui est des cellules, le mécanisme d'intégration, comme les mécanismes intra-cellulaires de transduction des signaux sont encore très largement inconnus. Dans le travail présenté dans le papier 1, nous avons étudié des cellules de mammifère d'un diamètre de quelques dizaines de microns et qui ont un déplacement de type fibroblastique.

## **- Les mécanismes moléculaires**

Un exposé très simplifié des mécanismes à l'œuvre dans la production de force à l'échelle moléculaire est exposé dans l'article 'Motilité' donné en annexe.

La grande variété des mouvements des organismes eucaryotes se fonde sur quelques mécanismes de production de force universels. Le plus connu implique des ATPases capables de se déplacer le long d'un polymère, les moteurs moléculaires. Ces ATPases sont très variées, mais il existe seulement deux types de polymères liés aux mouvements cellulaires : les microtubules et les microfilaments. Une propriété essentielle de ces polymères est le caractère polarisé de leur monomère. Cette polarité est à l'origine du mouvement des ATPases (pour un modèle physique voir la thèse de Andréa Parmeggiani, 2000). On devrait pouvoir logiquement distinguer quatre classes de moteurs moléculaires, selon qu'ils se déplacent dans un sens ou dans l'autre sur chaque type de filament. En fait, il n'en existe seulement trois, car les moteurs liés aux microfilaments, les myosines, ne se déplacent que dans une direction (vers le bout dit bout barbé ou bout plus). Cela reflète la spécialisation de ce couple moteur/polymère dans des phénomènes de contraction ou de transport sur de courtes distances, alors que les microtubules sont impliqués dans des transports sur de longues distances vers des régions spécialisées de la cellule, ce qui nécessite l'existence de moteurs spécialisés pour chaque direction.

Le mouvement des axonèmes repose sur la dynéine, moteur microtubulaire de bout moins, qui fait glisser les microtubules les uns par rapport aux autres et les courbe. En revanche, la partie de gain de terrain des cellules amiboïdes ne se joue pas uniquement avec les moteurs. Elle est fondée sur un double mécanisme : la polymérisation de l'actine qui pousse la membrane du lamellipode et l'ancrage des filaments dans des complexes transmembranaires qui vont interagir avec le substrat, les plaques d'adhésion focale. Les contractions des fibres acto-



myosiques serviraient plutôt au déplacement du corps cellulaire (pour un modèle voir Verkhovsky et al., 1999a). Dans le mouvement amiboïde, il y a donc trois niveaux de régulation possibles : la polymérisation de l'actine, l'assemblage des plaques d'adhésion et la contraction du gel acto-myosique.

Les molécules de signalisation liées au chimiotactisme sont reconnues par des récepteurs spécifiques situés au niveau de la membrane plasmique, qui activent des voies de transduction extrêmement complexes impliquant souvent des GTPases (petites ou grandes). Il est connu qu'un certain nombre de ces GTPases agissent sur la polymérisation de l'actine, mais aussi sur de nombreux effecteurs liés à la régulation de l'activité des myosines ou d'autres protéines associées à l'actine (pour des revues sur ce domaine très riche en publications récentes, voir Aspenstrom, 1999; Erickson and Cerione, 2001; Machesky and Insall, 1999; Mullins, 2000; Zigmond, 1996) . Il pourrait donc y avoir, localement, un effet direct sur les mécanismes de la motilité. Cependant, le véritable enjeu pour la cellule est d'intégrer les signaux périphériques pour déterminer une direction globale de migration (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

### **- Le cytosquelette**

Historiquement, le cytosquelette désigne une fraction insoluble des cellules, indépendante des principaux organites que sont le golgi, le réticulum ou le noyau, et qui a la capacité de produire du mouvement (de vésicules dans le cytoplasme, ou bien de fragments de cytoplasme isolés des cellules) et de se déformer. Cette entité particulière a donné lieu à de nombreuses expériences alors même qu'on ignorait presque tout de son contenu moléculaire (Thompson and Wolpert, 1963 ; Albrecht-Buehler, 1980).

Malgré la découverte des mécanismes moléculaires qui sont à l'origine des mouvements et des propriétés mécaniques des cellules, l'idée de cytosquelette reste intéressante, car elle désigne une échelle intermédiaire entre les composants moléculaires et la cellule (on peut

noter qu'on a aujourd'hui souvent tendance à inclure les membranes dans les réflexions sur le cytosquelette car il est désormais évident que leurs propriétés mécaniques sont fondamentales pour comprendre la mécanique cellulaire).

A cette échelle, il y a principalement deux questions : comment tous les systèmes qui composent le cytosquelette fonctionnent-ils ensemble pour former une masse cohésive et capable de se déplacer ? Et comment les signaux variés auxquels sont soumis les cellules (signaux mitogéniques, signaux de différenciation ou signaux liés à un tactisme) sont-ils intégrés et traduits en une réponse morphologique ?

D'un point de vue phylogénétique, il semble que les cellules eucaryotes aient opté pour deux grands types d'organisation.

Tout d'abord celui des unicellulaires ciliés ou flagellés, qui repose essentiellement sur les microtubules (et le moteur dynéine pour le mouvement de l'axonème). L'actine ne sert dans ces systèmes quasiment qu'au moment de la cytokinèse. Il faut noter qu'il existe dans ces organismes, de manière très développée par rapport aux autres eucaryotes, de nombreuses fibres contractiles en général sensibles à la concentration de calcium et dont la plupart contiennent principalement de la centrine. Chez les ciliés, ces fibres tapissent le cortex d'un réseau maillé (le réseau infraciliaire, Klotz et al., 1997) qui peut déformer la cellule en se contractant. Dans tous ces organismes, ces fibres contractiles relient le cortex, la base des flagelles (les cinétosomes) et le ou les noyaux.

Chez les organismes amiboïdes, les microfilaments d'actine, associés aux myosines, tiennent le rôle principal aussi bien pour ce qui est de la production de la force motrice que pour ce qui est de la contractilité (et même de l'association entre le système microtubulaire et le noyau, puisque un traitement à la cytochalasine D, qui dépolymérise les microfilaments, permet de dissocier le centrosome du noyau). Le système microtubulaire a dans ces organismes un rôle

de transport intracellulaire et de lien entre les éléments génétiques (chromosomes et noyau) et le cortex cellulaire.

On propose actuellement deux mécanismes pour expliquer les propriétés intégratives du cytosquelette : le premier repose sur des comportements collectifs des gels d'actine (et d'un certain nombre de protéines qui réticulent le gel et catalysent sa croissance) et des gels d'actine et de myosine. Les gels d'actine en polymérisant sont capables de produire une force et peuvent avoir un comportement cohérent qui leur permet de propulser des bactéries ou des vésicules de quelques microns de diamètre. Le mécanisme de cette propulsion a pu être expérimenté *in vitro* sur des billes dans un système minimal comprenant moins d'une dizaine de protéines (Cameron et al., 1999; Noireaux et al., 2000 ; Verkhovsky et al., 1999a; Verkhovsky et al., 1999b et pour des revues voir van Oudenaarden and Theriot, 1999 ; Borisy and Svitkina, 2000). Certains proposent que ce comportement puisse exister à des échelles plus grandes (van Oudenaarden and Theriot, 1999), mais il n'est pas démontré qu'il n'y aurait pas d'instabilités à partir d'une certaine taille. Les gels d'actine et de myosine sont capables de se contracter et d'avoir des comportement oscillants (travaux théoriques de Karsten Kurst, 2001) qui pourraient eux aussi avoir lieu à l'échelle de la cellule (Bornens et al., 1989).

Le second mécanisme propose un rôle intégrateur et régulateur du système microtubulaire (voir plus loin pour le rôle des microtubules et des protéines qui leur sont associées dans la régulation du système actine-myosine). Il faut bien noter que ces deux mécanismes sont complémentaires (ce n'est pas parce que des fragments cellulaires peuvent se déplacer dans des gradients, en l'absence de microtubule, que les microtubules n'ont aucun rôle quand ils sont là).

Les signaux extérieurs sont souvent transduits par l'intermédiaire de petites GTPase dont les effecteurs vont modifier des protéines du cytosquelette. Ces effecteurs sont souvent des

kinases. Une inhibition non spécifique, à l'aide d'une drogue, des kinases de cellules très motiles entraîne la dislocation de ces cellules (Verkhovsky et al., 1999b).

On peut enfin noter que le cytosquelette porte, dans son ensemble, des informations épigénétiques. Cela a été particulièrement bien mis en valeur grâce à des expériences réalisées sur des paramécies (Beisson and Sonnenborn, 1965). Ces cellules possèdent un cortex couvert de cils à l'ordonnement très précis. Si cet ordonnancement est perturbé par micromanipulation, la perturbation se perpétue sur des milliers de générations. Cela signifie que le cytosquelette ne désigne pas seulement une échelle d'espace différente de celle des mécanismes moléculaires, mais aussi une échelle de temps différente, intermédiaire entre l'échelle de temps des mécanismes d'auto-organisation et celle des mécanismes génétiques.

## **2. Centrosome et mouvement cellulaire : une vieille idée un peu confuse**

### **- Le mouvement cellulaire et le cinétosome**

#### *Histoire : le 'centre dynamique de la cellule'*

Dès le début du siècle, Lehnossek et Hennegy proposèrent que le centrosome, en se déplaçant vers la membrane plasmique, donne naissance aux cils ou aux flagelles dans les cellules animales et qu'il y aie donc identité entre les cinétosomes (les corpuscules observés à la base des axonèmes) et les centrioles (les corpuscules observés dans le centrosome). A cause de sa position aux pôles des fuseaux mitotiques des cellules animales et de son mode de reproduction, le centrosome était alors pour beaucoup l'organe de division. L'observation par Strasburger, toujours au tournant du siècle, de mitoses sans corpuscules polaires dans les plantes lui fit suggérer, conforté en cela par la découverte de Hennegy et Lehnossek, que les centrioles soient associés aux pôles en mitose pour être équitablement distribués entre les cellules filles, mais que leur vrai rôle était dans la formation des cils et des flagelles. C'est une

opinion toujours défendue, car il y a effectivement une grande corrélation entre la présence de centrioles canoniques et la présence d'axonèmes. Zimmermann, trente ans plus tard, proposa que les centrioles puissent aussi avoir un rôle dans la motilité des cellules amiboïdes, par conservation de leur fonction au cours de l'Evolution. Leur position, au centre de la cellule ou à la périphérie, étant lié au mode de propulsion.

### Le cinétosome

Le rôle du cinétosome dans le mouvement flagellaire est aujourd'hui bien établi chez les protistes : s'il ne produit pas la force, il joue un rôle dans l'assemblage de l'axonème et dans la régulation de son battement. Chez l'algue verte biflagellée *Spermatzoopsis similis*, un changement d'orientation des corps basaux du à la contraction d'une fibre en réponse à un signal calcique, est suivie d'un changement du type de battement de l'axonème (McFadden et al., 1987). Lorsque la fibre est relâché, le battement est de type ciliaire (asymétrique), lorsqu'elle est contractée, il est de type flagellaire (symétrique). Récemment, une modélisation théorique du fonctionnement de l'axonème a permis de montrer que les conditions imposées à la base du flagelle (base fixe ou libre et surtout direction de la base imposée ou pas) pouvaient modifier la forme de l'onde qui se propage le long de l'axonème (voir la thèse de S. Camalet, 2001). Le cas d'une extrémité libre pourrait correspondre à un spermatozoïde, dans la mesure où le flagelle est de dimensions beaucoup plus importantes que la tête. Ainsi, quand le flagelle bat, la tête bouge. Dans ces conditions, il n'y a pas de question d'orientation de la base du flagelle (d'ailleurs de nombreux spermatozoïdes n'ont plus de centriole à leur base). Au contraire, chez les algues vertes, le flagelle est bien maintenu. Lorsque la fibre intercentriolaire est contractée, la base du flagelle a une direction imposée, lorsque la fibre est relâchée, la direction est libre.

Il a aussi été proposé, sur des critères ultrastructuraux (la corrélation du plan de battement et de certaines structures des corps basaux), que d'autres fibres, qui enserrant le bout proximal

du corps basal, puissent le faire tourner sur son axe et ainsi faire varier le plan de battement du flagelle.

Enfin, chez les ciliés, qui ont des milliers d'axonèmes, l'organisation d'ensemble du cortex est fondée sur les symétries des corps basaux et sur le système de fibres qui les relie. Cette organisation est importante pour la motilité de l'organisme (pour une revue voir Beisson and Jerka-Dziadosz, 1999).

### Le centriole

Chez les métazoaires qui possèdent des cils, les corps basaux sont aussi ancrés dans la cellule par des fibres striées contractiles qui contiennent une protéine homologue à la centrine des protiste. Le rôle de ces fibres dans le battement des cils n'est pas bien estimé.

D'autre part, de nombreuses cellules possèdent des cils primaires non motiles dont les corps basaux sont toujours associés à des fibres. Certaines de ces cellules sont douées de motilité et il a été postulé qu'elles puissent se servir de leurs cils primaires pour se diriger - le cil servant de récepteur chimique ou mécanique - suite à l'observation d'une corrélation entre l'orientation du cil et la direction de migration (sur cellules fixées, en estimant la direction de migration à l'aide d'un ingénieux système appelé le 'phagokinetic track', qui consiste à regarder le trace laissée par les cellules sur un substrat recouvert de billes d'or, Albrecht-Buehler, 1977; Albrecht-Buehler and Bushnell, 1979). Malheureusement, cette voie de recherche n'a pas été poursuivie et les quelques expériences réalisées, bien que très intrigantes, ne sont pas vraiment conclusives. On peut ainsi imaginer que les fibres reliées aux cils primaires ne servent pas à orienter le corps basal mais à estimer son inclinaison (l'inclinaison du cil tend certaines fibres et en détend d'autres) et qu'elles soient en fait des mécanosenseurs capables ensuite de générer un signal. Cette hypothèse serait aussi intéressante à tester dans le cas des cils sensoriels (leurs corps basaux sont associés à des fibres de centrine, Wolfrum, 1995). En effet, l'algue verte flagellée *Chlamydomonas*

*reinhardtii* possède un organite photosensible qui contient des molécules homologues de celles des cils modifiés de l'œil. Or, cet organisme est capable de modifier son déplacement pour rester dans une certaine gamme de luminosité et on a vu qu'un changement de direction passe probablement par un changement d'orientation des corps basaux. Ainsi, on peut légitimement s'interroger sur le rôle des corps basaux dans le fonctionnement des cils sensoriels.

Les cellules qui n'ont pas de cil primaire contiennent elles aussi de la centrine, au niveau de leurs centrioles et, en plus faible quantité, dans des agrégats autour du centrosome. Bien qu'il n'ait pas été montré que dans ces conditions la centrine forme des fibres, il semble que ces structures soient sensibles au calcium, de même que le lien intercentriolaire (Baron et al., 1994; Paintrand et al., 1992).

Certains chercheurs ont cherché à observer une corrélation entre l'orientation du cylindre centriolaire et la motilité cellulaire. Il a pu être observé que dans les cellules motiles, le centriole parental, qui porte dans le type cellulaire étudié la plupart des microtubules, est préférentiellement perpendiculaire au substrat de migration (Alieva and Vorobjev, 1994; Alieva and Vorobjev, 1995; Gorgidze and Vorobjev, 1995). Cette orientation a pu être perturbée par des drogues. Ces études ne permettent pas de conclure à un rôle de cette orientation privilégiée. Dans la mesure où les microtubules sont ancrés à la périphérie du cylindre, on peut imaginer que, s'ils sont sous tension, ils imposent au centriole cette orientation perpendiculaire au plan de l'aster de microtubules (l'aster n'est pas complètement plan, mais est aplati du fait de l'ancrage de la cellule sur une surface plane). La petite taille des cylindres centriolaires a jusqu'à présent imposé l'utilisation de la microscopie électronique - pour avoir accès à leur orientation - ce qui a le défaut d'imposer la fixation des cellules. On perd alors la dynamique du processus qui est souvent essentielle à sa compréhension.

Toujours en relation avec le centriole, il a été proposé que la symétrie 9 des centrioles, puisse jouer un rôle dans le fait que les cellules changent préférentiellement de direction de migration avec un angle de 40° (Albrecht-Buehler and Bushnell, 1979, Albrecht-Buehler, 1979). Comme on sait aujourd'hui que le centriole parental possède aussi neuf bras qui ancrent chacun un faisceau de microtubules (voir la figure supplémentaire du papier 2), on pourrait trouver cette hypothèse séduisante. Elle est malheureusement très difficile à tester (peut-être grâce à des laser ?), et il faudrait déjà savoir si une cellule privée de microtubules continue ou non à changer de direction avec un angle de 40°.

Pour continuer l'analogie avec les corps basaux, la contraction du lien intercentriolaire ne modifie pas seulement l'orientation des centrioles, mais aussi leur écartement. Ainsi, plusieurs travaux rapportent des cas de séparation des centrioles, dont certains liés à une activation de la motilité en réponse à un facteur chimiotactique (Schliwa et al., 1983; Schliwa et al., 1982). Dans ce cas, la motilité des centrioles est liée aussi bien au système microfilamentaire qu'au système microtubulaire (Euteneuer and Schliwa, 1985).

### **- La polarité centrosome/noyau**

La deuxième idée qui a inspiré les travaux sur le lien entre le centrosome et la motilité cellulaire est l'idée d'une polarité intrinsèque de la cellule définie par le vecteur formé par le noyau et le centrosome (van Beneden, 1883). C'est encore une idée qui date de la fin du dix-neuvième siècle et de nombreuses expériences ont été menées sur la base de cette idée jusqu'à aujourd'hui. Beaucoup de ces expériences reposent sur de simples observations, dans des tissus ou dans différentes conditions de culture, de la corrélation entre la polarisation de la cellule (la polarisation du cortex cellulaire) et la position du centrosome. Dans certains tissus, la corrélation est forte, que le centrosome soit en avant ou en arrière du noyau par rapport à la direction de migration, dans d'autres, il n'y a pas de corrélation (trois revues détaillent cette



question, Bornens and Karsenti, 1984 ; Schliwa dans *The Centrosome*, 1992 et Schliwa et al., 1999).

Un système expérimental particulier a été développé pour étudier une cellule en train de se polariser : le wound healing (Gotlieb et al., 1981). Lorsqu'une blessure est pratiquée dans un tapis de cellules (BSC1, 3T3, cellules endothéliales), les cellules situées au bord de la blessure se polarisent et migrent pour la refermer. Dans ces conditions, les centrosomes, qui étaient au centre des cellules confluentes, se placent en avant du noyau. Cette position frontale avait laissé imaginer que le centrosome pouvait en quelque sorte dicter à la cellule la direction de son mouvement (hypothèse rapportée par M. Schliwa dans sa revue, mais probablement uniquement dans un but didactique, car elle était déjà écartée dix ans plus tôt). La cinétique du repositionnement du centrosome, toujours basée sur des cellules fixées, a conduit à conclure que cette polarité noyau-centrosome n'avait pas de signification dans la polarisation de ces cellules, car elle s'alignait dans un deuxième temps (Euteneuer and Schliwa, 1992).

Le centrosome n'est pas à l'origine du mouvement des flagelles, ni de celui des cellules amiboïdes. Il ne dicte pas non plus la direction de la migration (et on se demande bien comment il pourrait le faire). On pourrait aussi facilement imaginer un rôle inhibiteur du centrosome sur la migration, qui s'accorderait aux expériences montrant que les microtubules ont un rôle inhibiteur sur la migration cellulaire (Rich and Hoffstein, 1981 ; Kaverina et al., 2000) : ainsi le moteur acto-myosique 'piaffe', et si on le détache, il part au gallop. Tant que le système centrosome/microtubule est présent, il est contraint. De même, les expériences montrant la motilité de fragments cellulaires (Euteneuer and Schliwa, 1984; Verkhovskiy et al., 1999b), si elles nous renseignent sur le moteur, ne nous disent rien sur le centrosome, puisqu'il est absent.

Le fait que les centrosomes se déplacent vers l'avant de la cellule après que celle-ci s'est polarisée ne permet pas non plus de conclure quoi que ce soit sur ce déplacement. Un indice

est venu d'un travail sur l'amibe grégaire *Dyctyostelium*. Une lignée exprimant la  $\gamma$ -tubuline couplée à la GFP a permis d'établir que, dans le cas d'un déplacement chimiotactique, le centrosome se repositionnait toujours vers le pseudopode le plus proche de la direction du gradient. Ce repositionnement était suivi d'une rétraction de l'autre pseudopode, ce qui se traduisait par un mouvement global de la cellule dans la bonne direction (Ueda et al., 1997). Il avait été montré par ailleurs que si les microtubules de cette amibe étaient dépolymérisés, elle continuait à se déplacer normalement, mais était incapable de suivre un gradient de chimioattractant. Il a donc été proposé que le centrosome soit tiré par les microtubules vers le pseudopode qui se développerait dans la bonne direction, entraînant avec lui le noyau et le corps cellulaire. Ce repositionnement du centrosome permettrait en outre d'enrichir le pseudopode en microtubules, ce qui aurait pour effet de le stabiliser.

#### **-Le rôle des microtubules dans la motilité cellulaire**

A la même époque et dans les mêmes systèmes, de nombreux travaux ont porté sur le rôle des microtubules dans la polarisation de la cellule, indépendamment de la position des centrosomes. Depuis l'apparition des drogues affectant la polymérisation des microtubules, l'effet de la stabilisation ou de la dépolymérisation des microtubules sur la motilité des cellules a été étudié dans des systèmes très variés (aussi bien dans des conditions de mouvement au hasard que de mouvement dirigé, par exemple chimiotactique). Selon les systèmes, la motilité peut être inhibée (Bandmann et al., 1974; Bershadsky et al., 1991; Keller et al., 1984; Nikolai et al., 1999) ou renforcée (Danowski, 1989; Kaverina et al., 2000; Rich and Hoffstein, 1981 ; Dziezanowski et al., 1980). Parfois, elle ne semble pas affectée. Il semble néanmoins assez général qu'une inhibition de la dynamique des microtubules perturbe plus la motilité qu'une dépolymérisation complète (Grigoriev et al., 1999; Liao et al., 1995) et que la motilité dirigée est plus affectée que la motilité aléatoire (Malech et al., 1977).

Il a pu en outre être montré dans plusieurs systèmes permettant l'étude de la polarisation des cellules (polarisation des cellules épithéliales, Bre et al., 1987; Bre et al., 1990; wound healing, Gundersen et al., 1994 ou polarisation des neurones, Baas, 1997), qu'il y avait apparition de microtubules plus stables en corrélation avec la polarisation et avec la formation d'adhésions (avec le substrat ou entre cellules, Elbaum et al., 1999; Enomoto, 1996; Helfman et al., 1999; Kaverina et al., 1998; Rinnerthaler et al., 1988). Dans les cellules polarisées, ces microtubules plus stables, dont la tubuline  $\alpha$  a la particularité d'être modifiée (elle est détyrosinée), sont principalement concentrés dans la région du lamellipode actif (Robson and Burgoyne, 1989, Nagasaki et al., 1992). Depuis, ce champs de recherche s'est considérablement développé. Il a pu être montré que les microtubules interagissent avec les plaques d'adhésion et semblent réguler leur stabilité (Kaverina et al., 1999; Kaverina et al., 1998), et que, réciproquement, la surexpression d'une protéine d'ancrage, la cadhérine, s'accompagnait de l'apparition de microtubules stables non centrosomaux (Chausovsky et al., 2000).

De nombreuses études ont aussi pu montrer que l'arrivée d'un microtubule à proximité du cortex pouvait provoquer une activation rapide de mouvement cortical (Bershadsky and Vasiliev, 1993; Dunn et al., 1997; Rosania and Swanson, 1996; Waterman-Storer et al., 1999), bien que ce mouvement puisse aussi être activé par des voies indépendantes des microtubules. Ce type de mécanisme semble important pour le développement du cône de croissance des neurones (Tanaka et al., 1995).

Les mécanismes moléculaires commencent aussi à être compris. Ils impliquent le plus souvent les petite GTPases de la famille Ras qui agissent directement sur le système cortical, mais aussi sur les microtubules - ces protéines sont importantes, par exemple, pour établir la polarité du cortex de l'embryon de *C. elegans*, qui va ensuite servir à établir la position du fuseau, (Gotta et al., 2001; Grill et al., 2001; Kay and Hunter, 2001). Il semble qu'en retour, la

présence de microtubules puisse avoir une influence sur l'état de ces protéines (Waterman-Storer et al., 1999). On peut imaginer qu'ils apportent une activité, via des kinésines, ou au contraire qu'ils titrent une activité via les dynéines. Un tel mécanisme de titrage a été postulé pour la myosine elle-même, qui s'accumule au cortex de cellules lymphoblastiques dont les microtubules ont été dépolymérisés (Bornens et al., 1989). On peut cependant aussi imaginer, dans ce cas, que les microtubules apportent une activité qui dissocie la myosine du cortex.

En effet, le bout plus des microtubules, qui est le bout qui interagit avec le cortex, semble emporter avec lui de multiples protéines (Tirnauer and Bierer, 2000 ; Schuyler and Pellman, 2001). Certaines de ces protéines régulent sa dynamique, mais d'autres ont une action sur des complexes corticaux et sont impliquées dans des checkpoints du cycle de division cellulaire (Muhua et al., 1998). Ces protéines sont présentes chez tous les eucaryotes. Elles sont impliquées dans des processus de morphogénèse et de migration cellulaire, processus qui ont en commun de nécessiter une déformation corticale. Il est aussi primordial, dans la morphogénèse comme dans la migration cellulaire, de préserver le lien entre le noyau et le cortex (ne pas laisser le corps cellulaire en arrière dans la migration des neurones ou replacer le noyau au centre de la cellule lors de la croissance de *S.pombe* par exemple, Bloom, 2001).

Les complexes corticaux qui interagissent avec les microtubules sont de deux types (Schroer, 2001) : les complexes en relation avec l'adhésion cellulaire (Bershadsky et al., 1996) et avec l'actine corticale (Goode et al., 2000) et les complexes qui servent à ancrer les microtubules au cortex (Adames and Cooper, 2000). Ces deux types de complexes contiennent de la dynéine et permettent d'exercer une traction sur les microtubules. Il semble de plus qu'ils soient capables d'une réponse active à la tension, induisant le développement de câbles d'actine-myosine (Riveline et al., 2001, pour une revue, voir Geiger and Bershadsky, 2001). Tous ces processus passent toujours par des signalisations par les petites GTPases, mais une nouvelle voie de signalisation, qui régule l'activité de la dynéine vient d'être découverte.

Cette voie de signalisation est conservée chez tous les eucaryotes et est impliquée dans la régulation de la migration du noyau (pour une revue voir, Wynshaw-Boris and Gambello, 2001). Elle implique la kinase cdk5, la protéine LIS 1 et des protéines d'ancrage centrosomales et corticales (mNudE et NUDEL).

En conclusion, les signaux de polarisation externes peuvent certes agir directement sur le cortex cellulaire par la signalisation des petites GTPases, mais les microtubules sont impliqués dans de multiples voies de régulation touchant aux trois principaux mécanismes moléculaires de la motilité cellulaire : l'ancrage, la polymérisation d'actine et la contraction acto-myosique. Cela est susceptible de générer de multiples boucles de rétroaction, ce qui expliquerait la diversité des effets des drogues microtubulaires sur la motilité en fonction du système expérimental.

La présence de microtubules stables dans la région des lamellipodes actifs peut s'expliquer par l'interaction de leur bout plus avec les complexes membranaires. La fonction de ces microtubules, en plus des mécanismes de régulation rappelés ci-dessus pourrait être de favoriser le transport de vésicules, dont l'importance pour le mouvement cellulaire a été démontrée dans plusieurs systèmes - quand ce n'est pas tout simplement la finalité même de la polarisation, comme dans le cas des synapses lymphatiques.

### **- MTOC et motilité cellulaire**

Revenons au rôle possible du centrosome dans les mécanismes liés aux microtubules.

Sa réorientation vers l'avant de la cellule, sous l'action des dynéines corticales, pourrait permettre d'enrichir le lamellipode en microtubules, permettant ainsi la stabilisation des plaques d'adhésion ou le transport de vésicules.

De manière très générale (c'est aussi vrai en mitose), le centrosome relie le matériel génétique au cortex, via les microtubules et leur système d'ancrage cortical. En effet, le centrosome est toujours relié au noyau (voir la partie Phylogénie).

Personne n'a jamais cherché à savoir si ces processus s'accompagnaient d'une réponse active du centrosome. C'est un cas typique où la conception qu'on se fait couramment du centrosome est celle d'un simple MTOC, qui va passivement suivre la direction dans laquelle on le tire. Pourtant, dans le cas de la signalisation par le réseau associé à LIS 1, des protéines clés dans l'interaction de LIS 1 (qui est la protéine de signalisation) avec la dynéine sont des protéines à domaine coiled-coil. Il en existe deux, une spécifique du centrosome (mNudE interagit avec de nombreuses protéines centrosomiales dont la péricentrine) et une autre du cortex. Elles font partie de ces protéines liées plus ou moins directement aux microtubules, qui ont des domaines coil-coiled et une fonction de scaffold (localisation d'une protéine de signalisation), comme les AKAPs - dont AKAP 450 - ou la péricentrine au centrosome. Il ne serait pas étonnant que l'activité de ces protéines liées à la chaîne légère de la dynéine ou à la dynactine (Tynan et al., 2000) soient régulées par la tension des microtubules.

Il a souvent été noté que l'activation de la motilité s'accompagnait d'une séparation des centrioles. Jamais la possibilité n'est évoquée que cette séparation soit une réponse active de modification du lien intercentriolaire en réponse à la tension exercée par les microtubules ou à un signal cytoplasmique.

Deux expériences directes ont été réalisées par inactivation du centrosome à l'aide d'un laser, la première (Koonce et al., 1984) note une modification de la migration, mais on peut craindre des dommages aspécifiques, à cause du laser employé (un laser UV dont la longueur d'onde est absorbée par la cellule et qui cause des dommages même en dehors du point de focalisation). La deuxième expérience (A.Khodjakov, communication personnelle), réalisée dans de meilleures conditions de contrôle (avec un laser vert), n'a permis de détecter aucun

défaut de migration. Le travers de ces deux expériences est d'avoir été réalisées dans des conditions de mouvement aléatoire des cellules, dont on sait qu'il n'est souvent pas affecté par une dépolymérisation complète des microtubules (une expérience plus intéressante aurait donc peut-être été de perturber la migration avec du nocodazole ou du taxol à faible dose pour bloquer la dynamique des microtubules, puis de détruire le centrosome).

## **II. RESULTATS :**

### **1. Résumé des principaux résultats et des conclusions**

Des cellules humaines de type épithélial (HeLa), des cellules murines de type fibroblastique d'origine adulte (L929) ou embryonnaires (3T3) ont été transfectées puis sous-clonées pour obtenir des lignées exprimant stablement une protéine de fusion entre la GFP et la centrine 1 humaine. Cette protéine se concentre particulièrement dans la lumière distale des centrioles. Nous démontrons dans ce travail qu'elle constitue un très bon marqueur pour l'étude, dans des cellules vivantes, de la dynamique des centrioles (leurs mouvements et leur réplication). Sa localisation très précoce dans les pro-centrioles et sa localisation distale en font un excellent marqueur de l'avancement de la duplication des centrosomes et, par suite, de la phase du cycle de division cellulaire. Les mouvements des centrioles ont été étudiés dans les différentes phases de ce cycle. Nous avons pu observer un comportement particulier dans les cellules en G1 mais aussi dans les cytoplastes (cellules énucléées) provenant de cellules en G1 : un des deux centrioles se déplace transitoirement sur de grandes distances (jusqu'à une dizaine de microns), alors que l'autre reste habituellement proche du centroïde de la cellule. L'utilisation couplée de techniques de vidéo-microscopie, d'immuno-marquage et de microscopie électronique ont permis de conclure que c'est le centriole le plus jeune qui est mobile, alors que le centriole parental est immobile et se trouve au centre de l'aster principale de microtubules. Il a pu être déterminé qu'un bon marqueur du centriole paternel dans les cellules murines est la protéine ninéine. L'utilisation de ce marqueur nous a permis d'identifier le centriole père lors d'expériences de repousse des microtubules dans des cytoplastes contenant des centrioles plus ou moins éloignés ou bien ne comportant qu'un centriole père ou qu'un centriole fils, ou encore ne contenant aucun centriole. Le centriole parental est toujours associé à un aster abondant. En revanche, le centriole fils, bien qu'il nucléé autant de microtubules, n'est jamais associé à plus d'une dizaine d'entre eux. Nous



avons pu conclure, d'après le type de réseau microtubulaire assemblé dans ces différentes situations, que le centriole parental ancre les microtubules qui sont nucléés dans un rayon de quelques microns autour de lui, alors que le centriole fils relâche les microtubules qu'il nucléé. De plus, des expériences de dépolymérisation des microtubules et des microfilaments ainsi que des expérience d'inhibition des myosines, démontrent que le mouvement du centriole fils, bien qu'affecté par la dépolymérisation des microtubules, est principalement dépendant du système acto-myosique.

En conclusion, nous proposons un modèle suggérant que la cellule puisse réorganiser son réseau microtubulaire en faisant varier la distance intercentriolaire en corrélation avec l'activité du système acto-myosique.

## **2. Papier I : The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells**

Le rôle respectif du centriole parental et du nouveau centriole dans le comportement et l'activité du centrosome des cellules de vertébré.



# The Respective Contributions of the Mother and Daughter Centrioles to Centrosome Activity and Behavior in Vertebrate Cells<sup>⊙</sup>

Matthieu Piel,\* Pablo Meyer,\* Alexey Khodjakov,† Conly L. Rieder,† and Michel Bornens\*

\*Institut Curie, Section Recherche, UMR 144 du CNRS, 75248 Paris Cedex 05, France; and †Division of Molecular Medicine, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, New York 12201-0509

We have generated several stable cell lines expressing GFP-labeled centrin. This fusion protein becomes concentrated in the lumen of both centrioles, making them clearly visible in the living cell. Time-lapse fluorescence microscopy reveals that the centriole pair inherited after mitosis splits during or just after telophase. At this time the mother centriole remains near the cell center while the daughter migrates extensively throughout the cytoplasm. This differential behavior is not related to the presence of a nucleus because it is also observed in enucleated cells. The characteristic motions of the daughter centriole persist in the absence of microtubules (Mts), or actin, but are arrested when both Mts and actin filaments are disrupted.

As the centrioles replicate at the G<sub>1</sub>/S transition the movements exhibited by the original daughter become progressively attenuated, and by the onset of mitosis its behavior is indistinguishable from that of the mother centriole. While both centrioles possess associated  $\gamma$ -tubulin, and nucleate similar number of Mts in Mt repolymerization experiments, during G<sub>1</sub> and S only the mother centriole is located at the focus of the Mt array. A model, based on differences in Mt anchoring and release by the mother and daughter centrioles, is proposed to explain these results.

**Key words:** centrosome • centrioles • GFP • centrin • motility

## Introduction

During mitosis, animal cells inherit a single centrosome that contains a pair of centrioles, each of which is associated with a cloud of pericentriolar material (reviewed in Andersen, 1999; Mogensen, 1999; Schnackenberg and Palazzo, 1999; Tassin and Bornens, 1999). These two centrioles differ both structurally (Paintrand et al., 1992) and biochemically (Lange and Gull, 1995): the older “mother” centriole, which was formed at least 1.5 generations earlier, carries two sets of appendages (distal and sub-distal). In contrast, the younger “daughter” centriole, which was formed during the previous S phase, lacks these structures. This structural asymmetry appears to be due partly to the semiconservative nature of centrosome replication (Kochanski and Borisy, 1990).

Centrioles replicate during S phase concurrent with DNA replication. During this time a small “procentriole” bud forms adjacent to the proximal wall of each parenting centriole, which then gradually elongates (Kuriyama and Borisy, 1981). By G<sub>2</sub>, when the cell possesses a 4N DNA content, it also possesses four centrioles arranged into two pairs referred to as diplosomes. Within each diplosome the mother and daughter centrioles are orthogonally oriented

so that a line through the long axis of the daughter points to the wall of the mother. This relationship is then maintained through the ensuing mitosis. During the next cell cycle, a slow process of maturation of the daughter centriole takes place which transforms it into a fully differentiated centriole apparently similar in all respects to the mother centriole. In parallel, the centrosome matrix changes in size or structure, displaying a varying number of satellite structures, the significance of which is not clear (Rieder and Borisy, 1982; Vorobjev and Chentsov, 1982).

The function(s) of the centrioles within the centrosome remain unclear, although recent results demonstrate that they are required for organizing the centrosomal components into a single stable structure (Bobinac et al., 1998). Since the reproductive capacity of a centrosome depends on its centriole content (Sluder and Rieder, 1985), and since centrosomes lacking centrioles do not reproduce (Sluder et al., 1989), centrioles also likely play an important role in centrosome reproduction, which must be tightly controlled to maintain genetic stability.

The centrosomal components involved in microtubule (Mt)<sup>1</sup> nucleation (e.g.,  $\gamma$ -tubulin, HsSpc98p) are localized within the pericentriolar material (PCM) associated with

<sup>⊙</sup>The online version of this article contains supplemental material.

Dr. Michel Bornens, Institut Curie, Section Recherche, UMR 144 du CNRS, 26, rue d'ULM, 75248 Paris Cedex 05, France. Tel.: 01 42 34 64 20. Fax: 01 42 34 64 21. E-mail: mbornens@curie.fr

<sup>1</sup>Abbreviations used in this paper: CD, cytochalasin D; EM, electron microscopy; GFP, green fluorescent protein; LM, light microscopy; Mts, microtubules; ND, nocodazole; PCM, pericentriolar material.

each centriole (Moudjou et al., 1996; Tassin et al., 1998). At the EM level Mts are often seen in interphase cells to terminate on the sub-distal appendages surrounding the mother centriole (Gorgidze and Vorobjev, 1995). It is unclear, however, if these sites nucleate Mt assembly (Chretien et al., 1997) or serve simply to anchor minus ends of Mts nucleated elsewhere in the PCM.

Centrin is a small (20 kD) protein that concentrates within the centriole distal lumen (Paoletti et al., 1996; Middendorp et al., 1997). This protein appears in the centriole as soon as centrioles begin to form, and then remains associated with this organelle as it matures (Paoletti et al., 1996). Its exact function(s) remain to be determined, but recent evidence suggests that at least one isoform (centrin 3) is involved in centrosome reproduction (Middendorp et al., 2000). Because of its small size and striking concentration within the centriole, we reasoned that centrin would be useful for defining the behavior of centrioles throughout the cell cycle, in living cells, if it was expressed as a fusion with the green fluorescent protein (GFP).

In this study, we used time-lapse fluorescence microscopy and serial section EM to define, for the first time, the *in vivo* behavior of centrioles during the vertebrate somatic cell cycle. The data reveal that the mother and daughter centrioles differ in their behavior and in their respective contributions to forming the interphase Mt array.

## Materials and Methods

### Cell Culture, Cloning, and Synchronization

L929, NIH 3T3, and HeLa-B cells were grown in DME medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum.

Centrin cDNA was sub-cloned in the pEGFP-N1 vector (Clontech) and cells were transformed by electroporation. Stable clones expressing the centrin/GFP fusion protein were then isolated from each of the three parental cell lines, by using the limited dilution method in the presence of 500  $\mu\text{g/ml}$  G418. Multiple independent clones, expressing  $\sim 20$  times the endogenous level of centrin, were kept for each of the three parental cell lines. The centrioles in all of the clones exhibited a similar behavior to that described here.

Synchronization in early  $G_1$  was accomplished by a single thymidine block of 20 h (5 mM thymidine for L929 and 2 mM for HeLa). Mitotic cells were then collected by shakeoff 8 or 20 h after releasing the block (for L929 and HeLa, respectively). Cells were then replated on coverslips and used 2 h later. Synchronization at the  $G_1/S$  border was accomplished using the double-thymidine block technique. To determine the duration of S and  $G_2$  we incubated cells at various times after thymidine washout with 30  $\mu\text{M}$  BrdU for 15 min and then analyzed them by FACS<sup>®</sup>. The maximum content of S cells (by BrdU incorporation) was reached 1–4 h after release. The maximum number of  $G_2$  cells (double DNA content and no BrdU incorporation) was observed  $\sim 5$  h after release in L929 cells and 9–10 h in HeLa cells.

### Cell Enucleation

Enucleation was performed as described by Prescott et al. (1972). In brief, coverslip cultures were incubated at 37°C for 30 min in the presence of 1.5  $\mu\text{g/ml}$  cytochalasin D (CD; Sigma) and then centrifuged at 15,000  $g$  for 40 min at 37°C in the presence of CD. The cytoplasts were then rinsed with fresh drug-free medium and incubated for 4 h at 37°C before use. To obtain cytoplasts with more than two centrioles cells were treated with 0.25  $\mu\text{g/ml}$  CD for 24–48 h to induce the formation of multinucleated cells (Carter, 1967), and then enucleated as described above. To obtain centriole-free cytoplasts, or cytoplasts containing only one centriole, cells were enucleated in the presence of both 1.5  $\mu\text{g/ml}$  CD and 5  $\mu\text{g/ml}$  nocodazole (ND; Sigma; Karsenti et al., 1984).

### Drug Treatments

We used a combination of ND (5  $\mu\text{M}$ ) and cold (40 min on ice) to depolymerize Mts. This treatment depolymerizes even the most stable Mts in L929 cells, and these do not reassemble when the cells are subsequently incubated in warm media containing 5  $\mu\text{M}$  ND. To disrupt actin filaments cells were treated with 3  $\mu\text{g/ml}$  of CD for 30 min. Latrunculin A (Molecular Probes) was used at 1  $\mu\text{M}$  and added just before initiating observations. Butanedione Monoxime (BDM; Sigma) was used at 20  $\mu\text{M}$  and cells were observed 30 min after treatment.

### Microinjection of Rhodamine-Tubulin and Incorporation of the Shiga Toxin B Fragment

Rhodamine-tubulin (catalog number T331M; TEBU, Inc.) was microinjected using an automatic microinjector (Eppendorf). The B fragment of Shiga toxin was incorporated into cells using the method described by Mallard et al. (1998).

### Microscopy and Data Processing

For time-lapse imaging cells were plated on #1 1/2 coverslips (L929 cells were plated on coverslips coated with collagen and fibronectin to induce cell flattening). For brief (<1 h) experiments cells were maintained at 37°C in sealed chambers containing complete phenol red-free culture medium supplemented with 20 mM Hepes. Open chambers equilibrated in 5%  $\text{CO}_2$  and maintained at 37°C were used for longer experiments. Rhodamine-labeled cells were mounted in hermetically sealed chambers containing Oxyrase and lactic acid (Vorobjev et al., 1997).

Time-lapse Z-sequences were collected on a Leica DMIRBE microscope controlled by Metamorph software (Universal Imaging). This microscope was equipped with a piezoelectric device for rapid and reproducible focal changes, a 100 $\times$  1.4 NA Plan Apo lens, and a cooled CCD camera (MicroMax 5 MHz; Roper Scientific). The final magnification on the camera chip was 84 nm/pixel. Using a DG4 illumination device (DeMey, J., and J.B. Sibarita, manuscript in preparation) we could collect a Z-sequence through an entire cell, of two different wavelengths, in under 2 s.

As a rule 6–10 sequential Z-axis images were collected in 0.5- $\mu\text{m}$  steps every 2–30 s. However, as the cell rounded during late  $G_2$  and mitosis it was often necessary to collect as many as 30 Z-axis images. Centriole tracking was performed automatically by Metamorph in maximal-intensity projections computed from the original three-dimensional data sets.

### Same Cell Correlative Video, Immunofluorescence, and/or Electron Microscopy

To identify cells followed *in vivo* thought subsequent preparative procedures we cultured them on Celloclate coverslips (Eppendorf). For indirect immunofluorescence studies they were then rapidly extracted with 0.2% NP-40 in BRB80 (80 mM KPIPES, pH 6.8, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM EGTA) for 30 s, followed by fixation in a mixture of 2% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde in PBS for 3 min. After reducing free aldehydes with 0.1%  $\text{NaBH}_4$  in PBS, the coverslips were incubated in primary antibodies followed by the appropriate secondary antibody coupled to either cyanine 3 (red channel; Jackson ImmunoResearch) or AMKA (blue channel; Jackson ImmunoResearch). The green channel was used to record the GFP signal which was preserved by our fixation protocol.

After immunostaining, cells that had been followed *in vivo* were relocated and imaged on a Leica DMRXA microscope. Image stacks (200-nm steps) were recorded using a piezoelectric objective positioning device and a MicroMAX CCD camera (Princeton Instruments). With a 100 $\times$  1.4 NA objective the final magnification on the chip was 67 nm/pixel. All centrin, ninein and  $\gamma$ -tubulin images shown in this paper are maximal intensity projections, while Mts are presented as self-luminous reconstructions.

Serial section EM of cells previously followed *in vivo* was performed as detailed by Rieder and Cassels (1999).

### Supplemental Material

Video supplements for Figs. 2, 4, 5, and 9 are at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/149/2/317/DC1>. To ensure a good resolution of the movies, please check that the monitor of your computer is set on millions of colors or true colors (32 bits). All of the videos correspond to cells or cytoplasts displayed on figures or from which data were extracted, except for Fig. 3 for which a movie showing a  $G_2$  cytoplast is added. Refer to the respective figure legend for further explanation.

Video 1 corresponds to the cell shown on Fig. 2 B.

Videos 2 and 3 correspond to the S and G<sub>2</sub> cells shown on Fig. 3 and video 4 is a G<sub>2</sub> cytoplast shown for comparison: the behavior of the diplosomes in G<sub>2</sub> is the same in cells and in cytoplasts.

Video 5 corresponds to the G<sub>1</sub> cytoplast shown on Fig. 4 A, rotated 90°. Videos 6 and 7 correspond to the G<sub>1</sub> cytoplasts as shown in Fig. 4 injected with rhodamine-tubulin or having incorporated Shiga toxin B fragment coupled with rhodamine, respectively.

Videos 8–10 correspond to the G<sub>1</sub> cytoplasts treated with nocodazole and cold, cytochalasin D, or both, respectively, and whose centrioles trajectories are shown on Fig. 5 B. Video 11 shows videos 8–10 one after the other in the same file, thus making easier the comparison between different treatments.

Videos 12 and 13 correspond to the fields containing three G<sub>1</sub> cytoplasts shown respectively on the left and on the right in the left panel of Fig 9. Video 14 corresponds to the G<sub>1</sub> cytoplast containing four centrioles shown on the right panel of Fig 9.

## Results

### Distribution of GFP-Centrin

We established several stable (>50 passages) cell lines that express centrin as a NH<sub>2</sub>-terminal fusion with GFP. Multiple clones that exhibit growth rates similar to the parental cell lines were isolated from HeLa, NIH-3T3, and L929 cells. In this report, we illustrate our finding using data obtained from L929 clones because the mother and daughter centrioles in these cells are sufficiently separated during G<sub>1</sub> so that their individual behavior can be easily observed. In G<sub>1</sub> HeLa cells, centrioles remain relatively close to each other while in NIH 3T3 they are usually separated by distances greater than those seen in L929 cells. Despite these differences, the centrioles behave the same in all three cell lines. Thus, the phenomena described here are exhibited by a number of different vertebrate somatic cell lines.

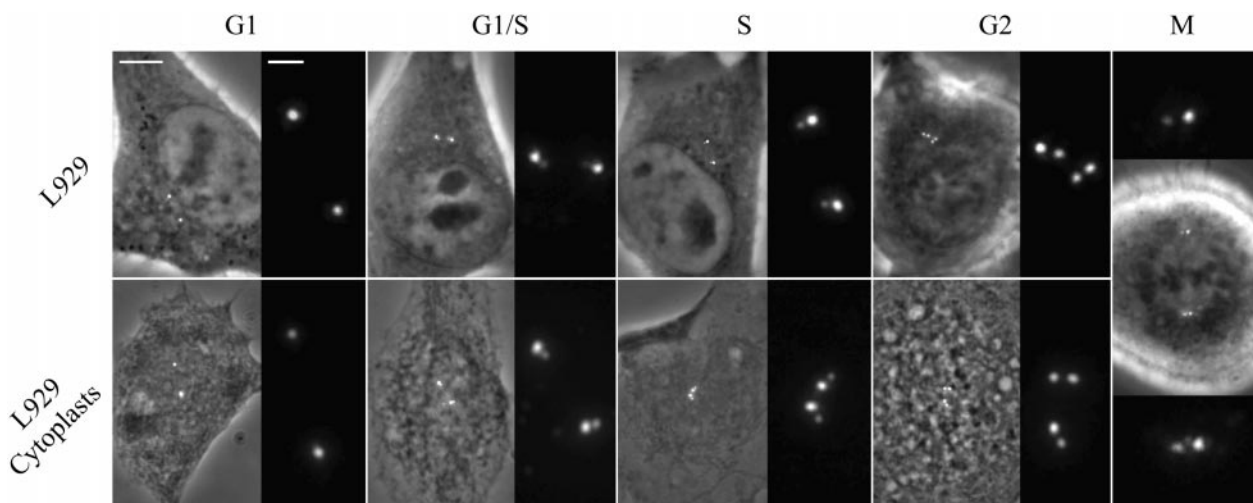
In all clones the distribution of GFP-centrin was very similar to that previously described by indirect immunofluorescence (Baron et al., 1992; Paoletti et al., 1996). The most obvious feature was a set of small strongly fluores-

cent dots that were usually located near the nucleus. In fixed cells these dots always stained with antibodies against typical centrosomal markers (e.g., poly-glutamylated tubulin,  $\gamma$ -tubulin, not shown).

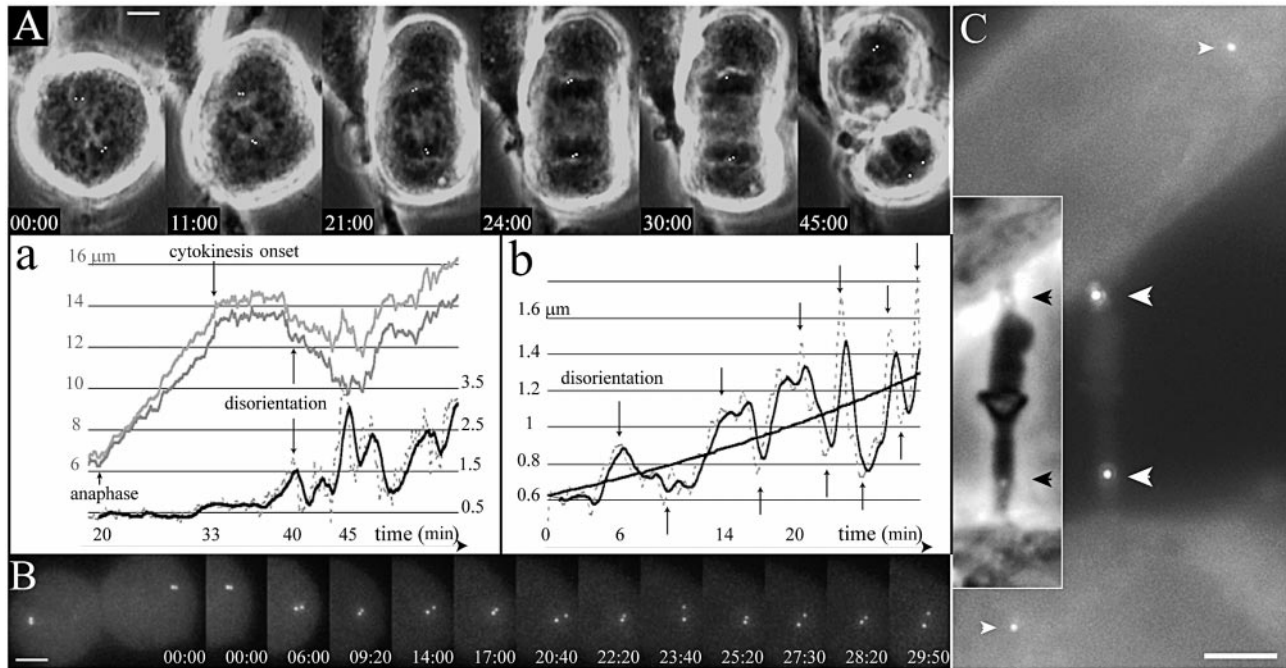
In an asynchronous population the number of centrin-GFP dots varied from cell to cell. Most cells contained two individual dots, positioned at variable distances from one another, but some contained two pairs of dots. In the latter cells the two dots comprising each pair often differed in their intensity. Correlative LM/EM studies confirmed that individual dots seen at the LM level were single centrioles, while the paired dots corresponded to orthogonally oriented mother/daughter centriole pairs (i.e., a diplosome; not shown).

To determine how centrin/GFP labeling changes with respect to the centrosome cycle we investigated the centrin/GFP distribution in synchronized cell populations. When cells were synchronized by mitotic shakeoff and replated for 2 h, 94% of cells ( $n > 200$ ) contained two individual dots. By contrast when cells were synchronized by a double-thymidine block and then allowed to progress into S-phase, 87% cells contained two pairs of dots with one member of each pair significantly brighter than the other. Finally, when cells were released from a double-thymidine block and allowed to progress into G<sub>2</sub>, 69% of cells contained two pairs of dots each of which was approximately equal in intensity, 25% still exhibiting the S-phase pattern. It is noteworthy that the distance separating the two dots comprising each diplosome increased as the cells progressed through S-G<sub>2</sub>, likely reflecting the elongation of the pro-centriole. From these results we conclude that centrin/GFP can be used as a live cell marker for the formation and maturation of individual centrioles, and is thus a very good marker of cell cycle progression. The typical distribution of centrin/GFP during the cell cycle is summarized in Fig. 1 (top row).

To investigate the behavior of the two centrioles within the centrosome, we used both whole cells and enucleated



**Figure 1.** Cell cycle changes in the distribution of centrin/GFP. Top row, L929 cells; bottom row, cytoplasts obtained from the same clone. For each period, the left picture is a superimposition of the GFP fluorescence and phase-contrast images, and the right picture is a 4 $\times$  magnification of the GFP channel. Note that the distance between the two GFP dots in each diplosome increases from G<sub>1</sub>/S to S and G<sub>2</sub>. Bar, 5  $\mu$ m for phase contrast images and 1  $\mu$ m for higher magnification.



**Figure 2.** Centriole disorientation occurs early after the onset of cytokinesis. (A) Selected frames from a time-lapse recording of mitosis in HeLa cell progressing from metaphase to telophase. The top row shows selected phase contrast pictures with the GFP signal in white (centrioles signals were manually enhanced), whereas the behavior of the bottom centrosome during the complete recording is described on the corresponding graphics (a). The two upper curves (grey) are the distance of each centriole of the bottom centrosome to a fixed point at the center of the metaphase plate in the first frame (scale on the left). It mainly shows the increasing distance during anaphase and the differential movements of each centriole after cytokinesis onset. The lower curves are the distance between the two centrioles of the bottom centrosome (dotted line), and a mobile mean fit (black line; scale in  $\mu\text{m}$  on the right). It shows an almost constant distance (the little increase at 33 min is due to a rotation of the diplosome) until time 40 min after metaphase shown on the top left (20 min after anaphase) when it reaches a distance incompatible with a close association of the two centrioles. (B) One sister cell spreading after furrowing onset. Z-series were acquired every 10 s. The bottom row shows the GFP signal of the right sister cell at times corresponding to the arrows on the graph (b), showing the alternative splitting and joining of the centrioles. The curves in b are the distance between the two centrioles of the right centrosome (dotted line), and a mobile mean fit (black line). A logarithmic fit shows the globally increasing distance between both centrioles. (C) Two daughter cells still linked by a midbody in early  $G_1$ . Two centrioles are located in the midbody (large white arrowheads) while the other two are far inside the cells (small white arrowheads). (Inset) The two black arrowheads show the location of the centrioles on the phase contrast picture of the midbody. Supplemental video is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/149/2/317/DC1>. Bars, 5  $\mu\text{m}$ .

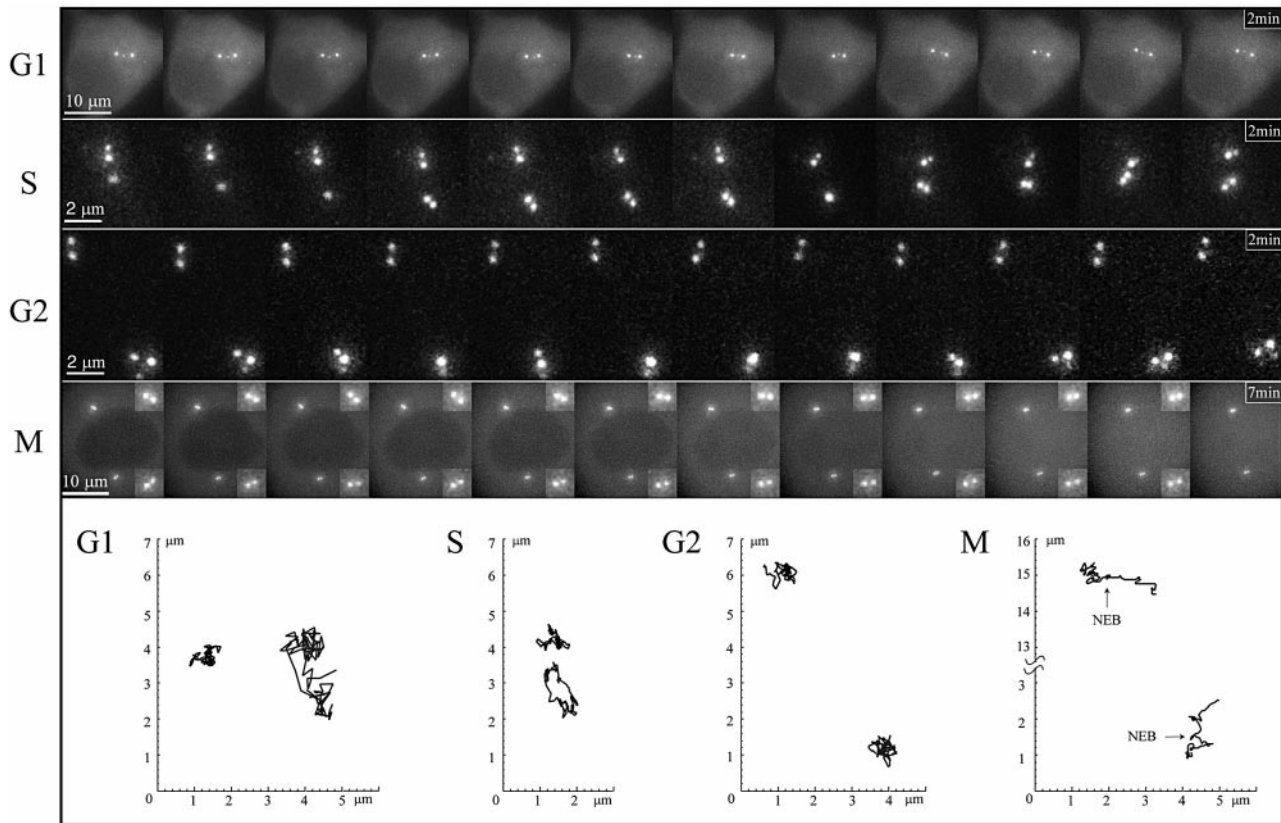
cells (cytoplasts). Cytoplasts were used to determine if the behavior of centrioles is influenced by the presence of nucleus. Additionally, cytoplasts are very flat and immobile, facilitating observation and analysis of centriole movements. In our hands, cytoplasts were viable for >50 h. The typical distribution of centrin/GFP in cytoplasts during different periods of cell cycle is summarized in Fig. 1 (bottom row).

### Centriole Behavior during the Cell Cycle

During mitosis each daughter cell inherits a single diplosome consisting of a closely associated mother and daughter centriole pair. We found that the mother and daughter centrioles comprising the diplosome separate into individual units during or just after telophase, well before the completion of cytokinesis (Fig. 2). Most of the time, that separation correlates with cell spreading. Once separated the mutual distance between the two centrioles fluctuates, but the average value increases steadily up to a few microns. From that moment on and up to the completion of

cytokinesis (i.e., breaking of the midbody), the two centrioles exhibit dramatically different behaviors. One remains almost stationary and near the geometrical center of the forming daughter cell while the other is wandering around and eventually migrates around the nucleus and towards the forming midbody (Fig. 2 C). Although the movement of one centriole toward the midbody sometimes occurred only in one of the daughter cells, it was usually observed in both, just before the completion of cytokinesis.

We then asked if this differential behavior persists throughout interphase. We found that during  $G_1$  one centriole remained relatively stationary while the other wandered throughout the cytoplasm (Fig. 3). This exaggerated motion of one centriole was greatly attenuated during S and  $G_2$  when the centrioles were in the process of replicating (Fig. 3). However, the two forming diplosomes still exhibited different behaviors during S and  $G_2$ ; one remained stationary while the other exhibited rocking motions even when translational movements were suppressed in  $G_2$  (Fig. 3, S and  $G_2$ ). This movement ceased during late  $G_2$ /prophase before nuclear envelope breakdown.



**Figure 3.** (Top) Selected frames from time-lapse sequences depicting centriole behavior during the cell cycle. The  $G_1$ , S and  $G_2$  sequences were recorded at 1 frame/2 s, and every 5th frame is shown here. The M series was recorded at 1 frame/5 s, and every 7th frame is shown here (insets show each diplosome at threefold magnification). (Bottom) Position plots depicting the trajectories of the centrioles shown above. One centriole remains stationary during all phases of the cell cycle while the other moves extensively during  $G_1$  and then gradually becomes sessile. Note that one of the two diplosomes (the bottom one in these images) exhibits rocking movements during S and  $G_2$ . Supplemental video is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/149/2/317/DC1>.

Since the centrosome has been shown to be tightly associated with the nucleus in some cells (Bornens, 1977; Fais et al., 1984), we asked if the relative immotility of one centriole during  $G_1$  was due to its attachment to the nucleus. To answer this question we followed the behavior of centrioles in cytoplasts obtained from L929 cells at various stages of the cell cycle. We found that the two centrioles in  $G_1$  cytoplasts behaved, in all respects, as those in nucleated cells (Fig. 4 A). It was noteworthy that the most stable centriole was always located near the geometrical center of the cell while the motile centriole could wander across the entire cell (Fig. 4 A). Centriole behavior in S or  $G_2$  cytoplasts was also indistinguishable from that observed in whole S or  $G_2$  cells. The ratio between the mean velocity of motile and nonmotile centrioles decreased from about  $1.8 \pm 0.4$  during  $G_1$  to  $1.3 \pm 0.2$  during S and further to  $1 \pm 0.1$  during  $G_2$  ( $n \sim 10$  cells in each case).

We next asked how Mts were distributed around the motile and nonmotile centrioles. To answer this question we followed living cytoplasts after having either microinjected them with rhodamine-labeled tubulin or incubated them with a living marker for the Golgi apparatus (the internalized B fragment of the Shiga toxin whom internalization leads, at the steady-state to an accumulation in the Golgi; Mallard et al., 1998). We found that the centrally lo-

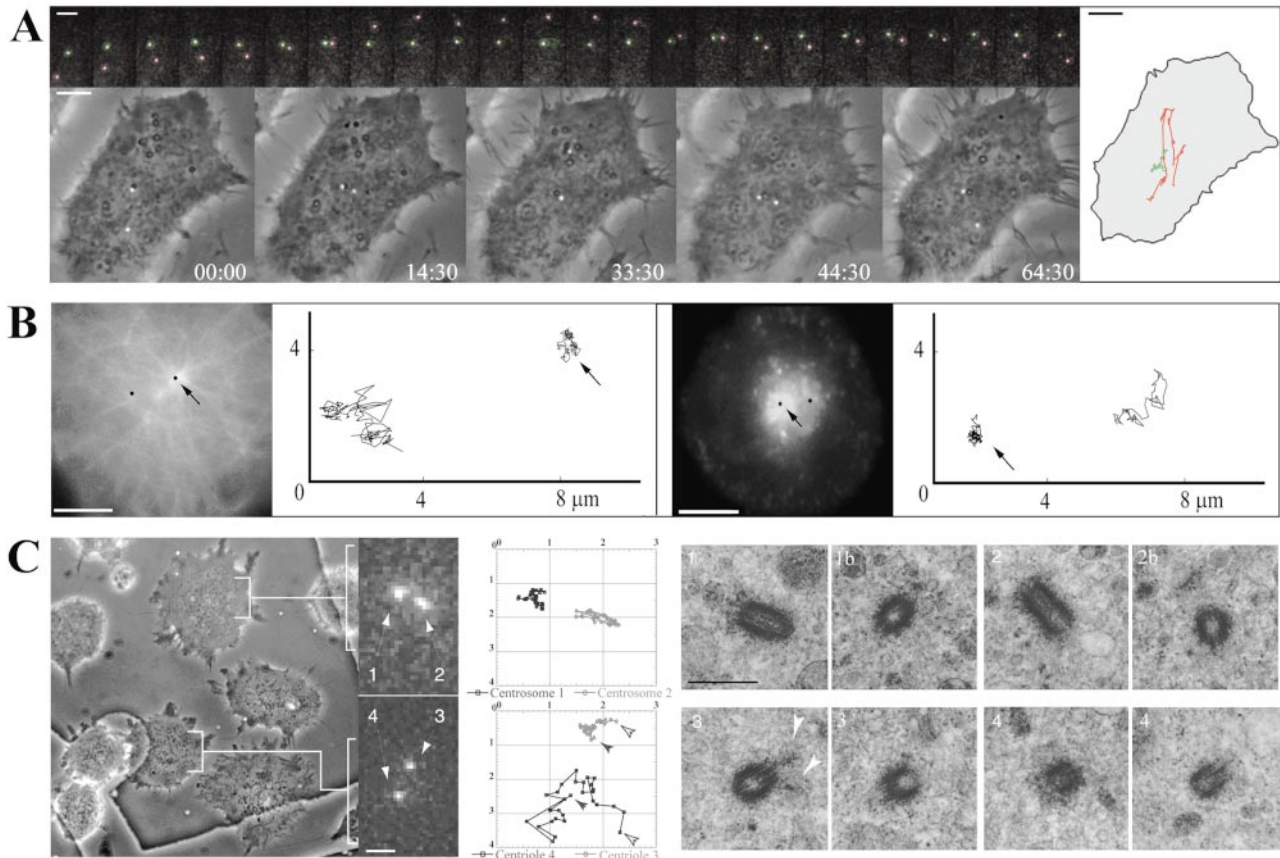
cated nonmotile centriole was always positioned at the center of a radial array of rhodamine-labeled Mts, whereas the motile one was off-center and not associated with a significant Mt array (Fig. 4 B). The Shiga toxin B fragment stained a large central area that usually contained both centrioles. However, as a rule the nonmotile centriole was positioned in the center of this region.

Next we conducted a serial section EM analysis of cells previously followed *in vivo* to determine which of the centrioles in our cells was the mother (Fig. 4 C). In all seven cytoplasts containing one motile and one stationary centriole, the stationary centriole was always found to be the mother based on the presence of sub-distal appendages. By contrast, the centrioles in adjacent cytoplasts, in which all GFP-centrin dots remained relatively stationary, were always found to be replicating ( $n = 5$ ).

#### **Effects of Nocodazole and Cytochalasin D on Centriole Behavior during $G_1$**

To determine if the differential behavior of mother and daughter centrioles during  $G_1$  depends on the presence of Mts and/or actin filaments we analyzed centriole movements in  $G_1$  cytoplasts treated with either ND ( $5 \mu\text{M}$ ), CD ( $3 \mu\text{g/ml}$ ), or both. For these analyses we recorded time-





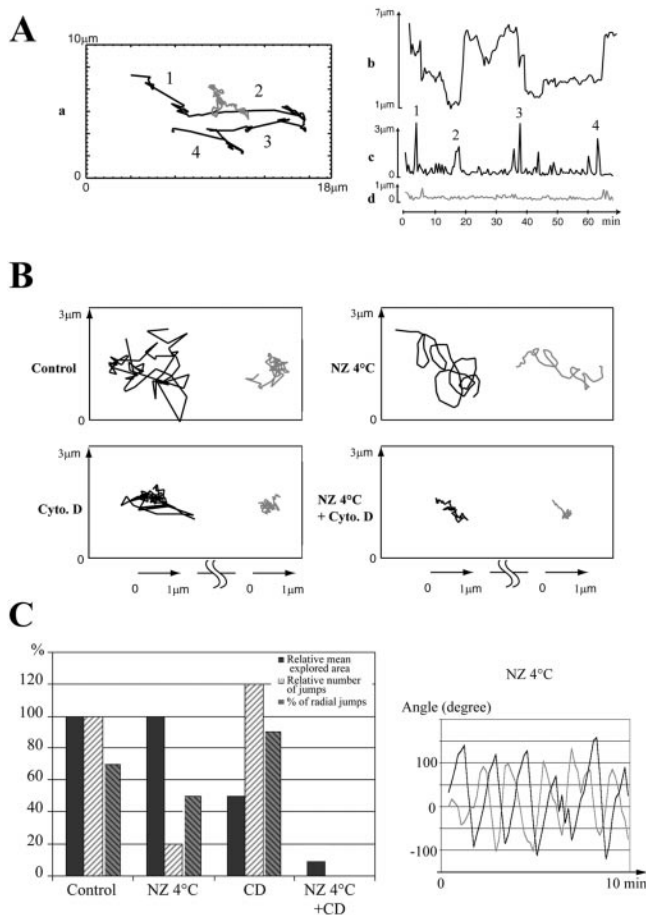
**Figure 4.** (A) Centriole behavior in G<sub>1</sub> cytoplasts. The top row is of GFP images (at 6-min intervals) in which the nonmotile centriole was colored green while the motile one red. In the bottom row the GFP images are superimposed on phase-contrast images of the same cell (time = min/s). The diagram on the right represents the centrioles trajectories in relation to the cell boundaries. (B) The immotile centriole acts as the centrosome. G<sub>1</sub> cytoplasts injected with rhodamine-tubulin (left panel) or having incorporated the B fragment of Shiga toxin coupled with Cyanin 3 (right panel) were video-recorded in two channels (GFP and rhodamine) during 10 min with a 4-s time-lapse. The pictures shown correspond to the first frame. The trajectories of the centrioles (in black on the pictures) are shown on the right. Arrows point to the immotile centriole. (C) The immotile centriole is the mother centriole. Movements of centrioles were recorded during 20 min, with 30-s time-lapse, in cytoplasts seeded on a gridded coverslip which were then flat embedded and processed for EM (see Materials and Methods). (Left) Phase contrast and GFP signals of the last frame. (Middle) Trajectories. The GFP signal appears pixelized because pictures were acquired at low resolution (63× objective and binning mode) in order to have at least 10 cells in a field. In these conditions, it was not possible to resolve the buds in duplicating centrioles at the optical level. (Right) High-voltage EM after semi-thick serial sectioning. The top row corresponds to the upper cytoplast and the bottom row to the lower cytoplast. The upper cytoplast contains two immotile GFP dots (1 and 2) which were revealed as two diplosomes by EM (1 and 1b, 2 and 2b). The lower cytoplast contains a motile (4) and an immotile (3) GFP dot, which corresponded to two centrioles. Two consecutive serial sections of each centriole are presented. The immotile centriole was identified as the mother centriole by the presence of appendages (white arrowheads). Supplemental video is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/149/2/317/DC1>. Bars: (A and B) 5 μm; (C, GFP signal image) 2 μm; (C, phase contrast image) 8 μm.

lapse sequences at high temporal resolution (1 frame every 2 s). Even at this high framing rate we could follow centriole movement for ~10 min before the GFP signal photobleached significantly. For these studies we chose to analyze two parameters of centriole behavior: the number of fast movement periods per unit of time, and the area covered by centriole motions (i.e., the root mean square of the excursion:  $[\langle (X - \langle X \rangle)^2 \rangle + \langle (Y - \langle Y \rangle)^2 \rangle]^{1/2}$ ). The latter parameter is independent of the framing rate and allows one to determine if the centriole exhibited persistent motion.

The results of these studies are summarized in Fig. 5. In most untreated cytoplasts the daughter centriole exhibited brief periods of rapid movement (numbers in Fig. 5 A) in-

errupted by longer periods of slower motion. The typical trajectory of the two centrioles is illustrated in Fig. 5 A. When compared with untreated cytoplasts, the trajectories of both centrioles became much smoother when Mts were completely disassembled by ND (Fig. 5 B). Under these conditions the centrioles no longer exhibited sudden direction changes, but the daughter centriole still remained more motile than the mother centriole. Even after a 4-h incubation in ND most mother centrioles remained positioned near the geometrical center of the cell. Remarkably, the mother and the daughter centrioles had very correlated movements (Fig. 5 C).

The extensive motion of daughter centrioles persisted in CD-treated cytoplasts, but the movements were more



**Figure 5.** Analysis of centriole movements in G1 cytoplasts. (A) Quantification of centrioles movements in the control G1 cytoplast shown in Fig. 4. (a) Corresponding trajectories; (b) distance between centrioles; (c and d) distances covered between two frames (30 s) by the daughter centriole (c) and the mother centriole (d). The numbers indicate periods of rapid movements of the daughter centriole. Between these periods the daughter centriole kept jolting while the mother centriole did not. (B) Drug effect on centrioles movements. The modifications of the trajectories induced by ND or CD are strikingly different, revealing that Mts and actin filaments drive two components of centrioles movements (see text). When both systems were impaired, centriole movements were minimal. (C, left) Quantification of the drug experiments on the movement of the daughter. Note that Mt disassembly reduced drastically the number of rapid movements (jumps) whereas impairing the actin system reduced the explored area. Note also that in CD-treated cytoplasts, movements of the daughter centriole are mostly radial with respect to the mother centriole. (Right) Correlation of mother and daughter centrioles movements in cytoplasts treated with ND. Each curve represents the angle variation over time between two consecutive segments of the trajectory of each centriole (dark line, motile centriole; grey line, immotile centriole). Note the phase shift between the two curves. Supplemental video is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/149/2/317/DC1>.

abrupt compared with untreated cytoplasts (Fig. 5 B). The same effect was observed when cytoplasts were treated with Latrunculin A (actin inhibitor) or BDM (a myosin inhibitor). In BDM-treated cytoplasts this effect was even more prominent, suggesting that the dependency of centri-

ole movement on microfilaments is mediated by myosin (data not shown).

When Mts and microfilaments were both disrupted by the combined action of ND and CD all centrioles ceased moving and exhibited only brief tumbling motions (Fig. 5 B).

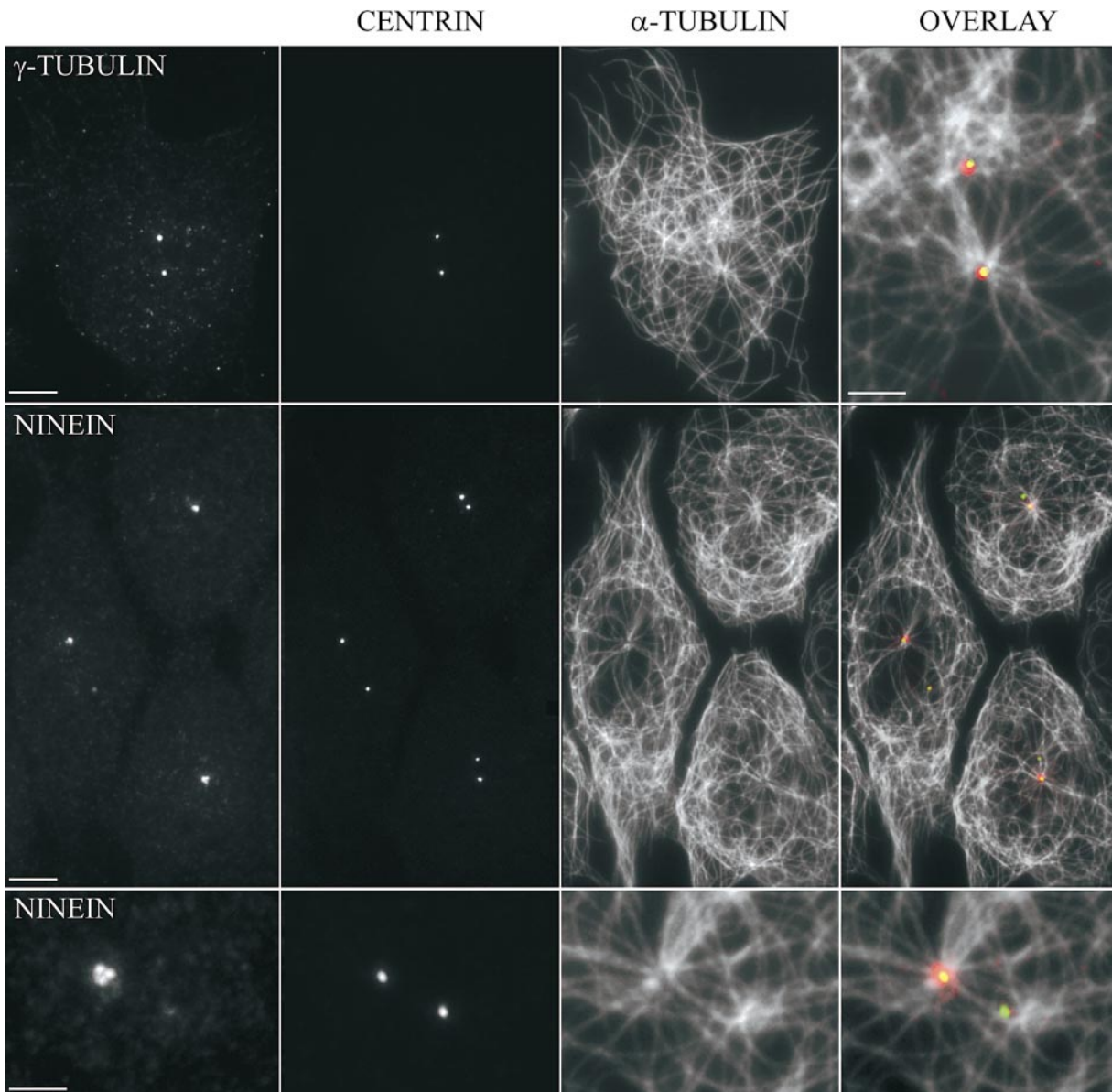
### ***The Respective Contribution of the Mother and Daughter Centrioles in Forming the Interphase Mt Array***

As noted above, we found that the nonmotile mother centriole was associated with a typical radial array of Mts whereas the motile daughter centriole had either no obvious direct interactions with the Mt array, or was associated with only a few Mts (Fig. 4 B). The different density of Mts associated with the mother and daughter centrioles in our cells could be due to differences in their nucleating potential and/or their ability to anchor Mts. In an attempt to differentiate between these possibilities, we determined the relative content between the mother and daughter centrioles of the Mt-nucleating protein  $\gamma$ -tubulin and the Mt-anchoring protein ninein (Mogensen et al., 1999). As illustrated in Fig. 6, the amount of  $\gamma$ -tubulin associated with each centriole (or diplosome during S-G<sub>2</sub>) was very similar. However, ninein was associated primarily if not exclusively with the mother centriole during G<sub>1</sub>, but with both diplosomes during S-G<sub>2</sub> (Fig. 6).

As shown in Fig. 7 A, only the ninein-containing centriole maintained an aster of Mts after treatment with low doses of ND. In agreement with  $\gamma$ -tubulin immunolocalization, both centrioles re-nucleated a comparable number of Mts after complete disassembly (Fig. 7 B). Similar numbers of short Mts were found to be arranged radially around both centrioles 2 min after washing ND-treated cytoplasts. By contrast, Mt arrays were associated only with the ninein-containing mother centrioles 15 min after ND washout. After 15 min regrowth, a common and conspicuous radial array of Mts was observed if the two centrioles were close to each other (Fig. 7 B, top), but some “free” cortical Mts were also observed when the two centrioles were split apart (Fig. 7 B, bottom). Moreover, many free short Mts were observed at 5 min regrowth when centrioles were split.

### ***Mts Organization and Centriole Behavior in Cytoplasts Containing One or More than Two Centrioles***

To further investigate the specific contribution of the daughter and the mother centrioles to the formation of the interphase Mt array, we enucleated synchronized G<sub>1</sub> cells in the presence of both ND and CD which produced many cytoplasts that contained only one centriole (either mother or daughter) or no centrioles at all (Karsenti et al., 1984). When Mts were disassembled in the cytoplasts, and then allowed to repolymerize, the ninein-containing centrioles were always centrally located and associated with Mt arrays 15 min after ND washout, whereas those centrioles lacking ninein were in a peripheral location and not associated with radial Mt arrays (Fig. 8). In the latter cases, the Mts were curly, located primarily at the periphery of the cytoplast, and were more numerous than in cytoplasts lacking both centrioles. Peripheral Mts were also



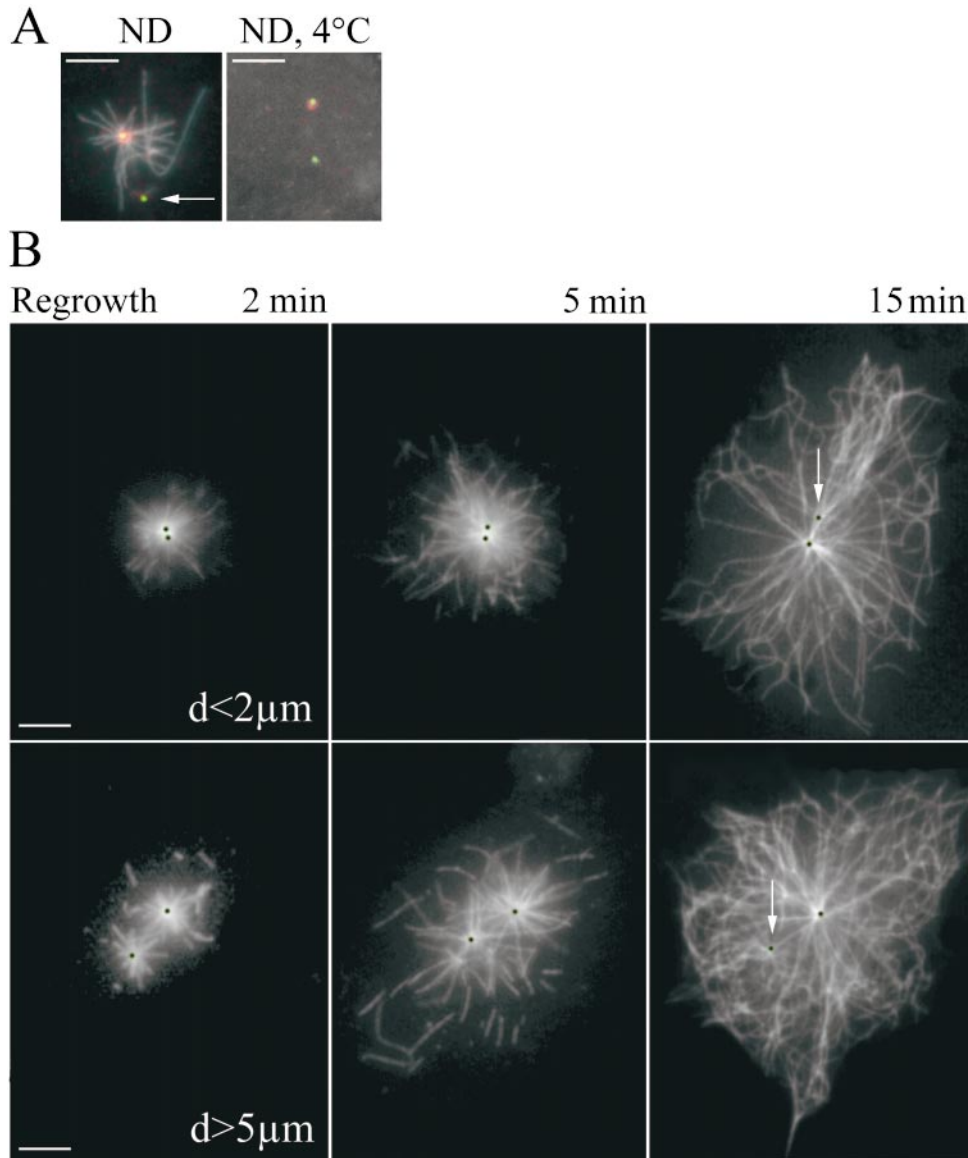
**Figure 6.**  $\gamma$ -Tubulin associates with both centrioles, whereas ninein associates with the mother centriole only. G1 cytoplasts from cells expressing GFP-centrin were fixed and stained with anti- $\alpha$ -tubulin antibody or with either an anti- $\gamma$ -tubulin or an anti-ninein antibody. Note that the ninein staining on the daughter centriole is very weak, whereas it is conspicuous and organized in several blobs, most often three, on the mother centriole. Note also on the bottom row the converging bundles of Mts abutting in the ninein blobs. On the top row, one can see that nonaxstral Mts are numerous in the vicinity of the daughter centriole. Bars: 5  $\mu$ m or 2  $\mu$ m for the bottom row and the top-right picture.

more abundant in cytoplasts with mother and daughter centrioles than in cytoplasts containing the mother centriole only. Thus, the presence of peripheral Mts correlates with the presence of the daughter centriole, suggesting that they were nucleated by the latter.

This experiment also demonstrates that the mother centriole does not simply out-compete the daughter for those components (e.g., ninein) required for anchoring Mts. Rather, the younger daughter is not yet competent to recruit these components from the cytoplasmic pool and cannot mimic the mother in her absence.

In cytoplasts containing a single centriole, the centri-

ole either remained relatively stationary or wandered throughout the cell (Fig. 9). An IMF analysis of these cells revealed that the stationary centriole was always associated with ninein and a Mt array, whereas the motile centriole lacked both (data not shown). Nonmotile centrioles were always positioned near the geometric center of cytoplasts containing only one centriole, whereas motile ones were often located near the periphery. These latter centrioles exhibited motions roughly parallel to the cell edge, seldom directed towards the cell center. This behavior differs from that found in cytoplasts containing a full complement of centrioles (i.e., one mother and one daughter) in



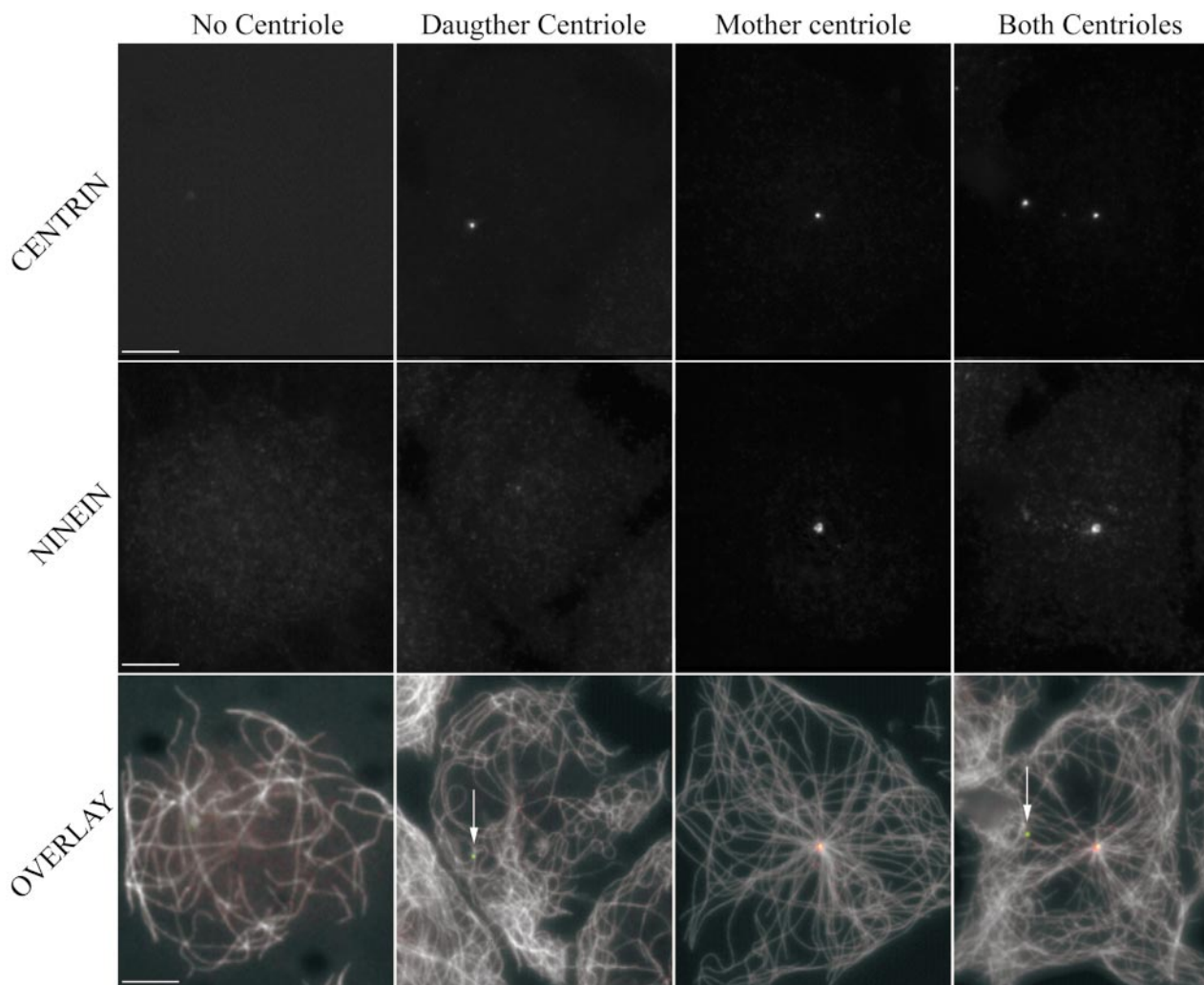
**Figure 7.** Stable Mts are anchored at the mother centriole and Mts are nucleated by both centrioles. (A, left) Cytoplasts treated during 10 min with  $1 \mu\text{M}$  ND were fixed and stained with an anti- $\alpha$ -tubulin antibody (acquired in the blue channel and shown in grey), and an anti-ninein antibody (red). GFP-centrin signal is shown in green. Arrow points to the daughter centriole that does not anchor stable Mts. (Right) Cytoplasts treated during 40 min with  $5 \mu\text{M}$  ND at  $4^\circ\text{C}$  do not contain Mts. Note that ninein is still associated with one centriole only. (B) Mt regrowth pattern depends upon the distance between both centrioles. After complete Mt depolymerization, the drug was washed and cytoplasts were fixed after 2, 5, or 15 min incubation at  $37^\circ\text{C}$  and stained with an anti- $\alpha$ -tubulin antibody. GFP signals are localized by black dots. White arrows indicate the daughter centriole, to which few Mts are associated at 15 min. (Top row) A typical Mt pattern observed in cytoplasts with two close centrioles. (Bottom row) Cytoplasts with distant centrioles. Note the released Mts at 5 min in the bottom row and the absence of peripheral Mts in the top row at 15 min. Bars,  $5 \mu\text{m}$ .

which the daughter centriole often exhibits motions towards and away from the centrally located mother. Finally, in cytoplasts containing two mother and two daughter centrioles, two remained relatively motionless while two were highly motile (Fig. 9, right panel). As in our previous studies, the only centrioles associated with radial arrays of Mts were the immotile (mother) centrioles (not shown).

### Discussion

Many observations of the centrosome in the past, either in situ or after isolation, have suggested a great complexity of this organelle. But most often obtained on fixed cells, structural features have been difficult to integrate into a coherent and reliable model of the centrosome organization. Here, by observing the centrosome in living cells, and in spite of a much lower resolution than that of EM, one could get at a more integrated view of the centrosome. Our work reveals novel features of the centrosome dy-

namics. First, splitting of centrioles in each postmitotic centrosome, which corresponds to the moment when orthogonal orientation is lost, occurs soon after anaphase, long before cytokinesis is completed. Second, the two centrioles of postmitotic cells demonstrate differential movements, one maintaining a central and stable location, whereas the other has a wide and eccentric trajectory. Third, the motile centriole progressively slows down from the onset of centriole duplication at the G1/S border, up to late G2; although maintaining a stable location within the cell once duplicated (in G2), the former motile centriole and its associated pro-centriole conserve more independence with respect to the surrounding cytoplasm until the onset of mitosis where it stops rocking completely. We also demonstrate a specific contribution of each centriole to the activity of the centrosome: both centrioles nucleate Mts but only the mother centriole anchors them. A general conclusion consistent with all the observations reported in this work is that the behavior of individual centrioles is maturation-dependent, correlated with the



**Figure 8.** Cytoplasts containing different centrosomes show different Mt organization. Cells were enucleated in the presence of ND in order to obtain cytoplasts with either no centriole, one centriole (daughter centriole or mother centriole), or two centrioles (see Materials and Methods). Mts were totally depolymerized. Cytoplasts were fixed after 15 min in regrowth conditions and stained for ninein (second row or red in the third row) and  $\alpha$ -tubulin. GFP-centrin is shown on the first row. White arrows indicate the daughter centrioles. Bars, 5  $\mu$ m.

generation process of these organelles. In other words, one centriole cannot replace the other one in a centrosome.

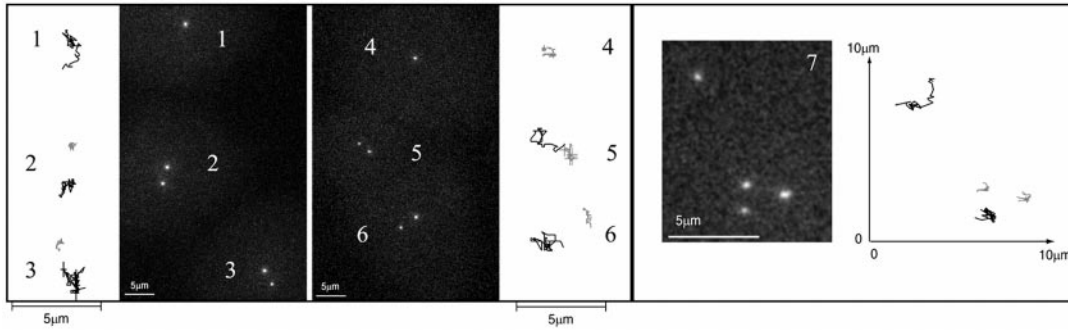
***The Two Centrioles-Centrosome: A Constitutive Generational Asymmetry of the Centriole Pair Necessary for Centrosome Function***

***Centriole Movements and the Interaction of the Centrosome with the Surrounding Cytoplasm.*** The analysis of the centrosome dynamics in vivo suggests the existence of an intercentriole link. Even when Mts were totally depolymerized, there was still a strong correlation between the smooth movements of the two centrioles, even when they were microns apart (see Fig. 5 C). This is in agreement with the observation that, once isolated from cultured cells, centrosomes are always composed of the two centrioles associated with a complex filament network which seems to link them at the proximal ends (Bornens et al.,

1987; Paintrand et al., 1992). The biochemical nature of this material, which corresponds broadly to the centrosome matrix, and the way in which the distance between centrioles is controlled ( $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, etc.) will deserve further study.

Wide excursions of the daughter centriole are mainly due to acto-myosin activity (see quantification in Fig. 5 B). This suggests that the motile centriole could be driven either by global cytoplasmic actin-dependent movements, or by a direct interaction with the acto-myosin system. Recent reports favor the last interpretation, as an accumulation of the myosin V isoform at the centrosome has been demonstrated (Espreafico et al., 1998; Tsakraklides et al., 1999). In addition, interactions of the microtubules with the actin cytoskeleton, through dynactin for example (Koonce et al., 1999), could also drive centriole movements (Euteneuer and Schliwa, 1985).

A maturation-dependent anchorage of the centrosome within the cytoplasm, distinct from the Mt-dependent cen-



**Figure 9.** G1 cytoplasts with variable numbers of centrioles. (Left) Two fields from two independent experiments are shown that both contain a cytoplast having only one centriole (1 and 4), and two cytoplasts having two centrioles (2, 3 and 5, 6). The trajectories video recorded during 10 min every 10 s are presented on each side. Cytoplast 1 contained a motile centriole while cytoplast 4 contained an immotile one. (Right) One G1 cytoplast (7) containing four centrioles (see Materials and Methods). The trajectories, recorded during 20 min every 30 s, show two motile and two immotile centrioles. The GFP pictures correspond to the first frame of each recording. Supplemental video is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/149/2/317/DC1>.

tering of the mother centriole, might involve the centrosomal matrix: when Mts were depolymerized in S or G2, the daughter centriole did not recover the motility observed in G1 (not shown). Interactions of the centrosomal matrix with other cytoskeletal components such as intermediate filaments or membranes will deserve further characterization. One may recall here that cells possessing a primary cilium provide an example of how the mother centriole could be anchored independently of the Mts. The distal end of the mother centriole interacts directly with the plasma membrane through its distal appendages. These structures which are observed in centrosomes isolated from cells which never grow a primary cilium (Paintrand et al., 1992) are thus candidates for anchoring the immotile centriole in the cytoplasm.

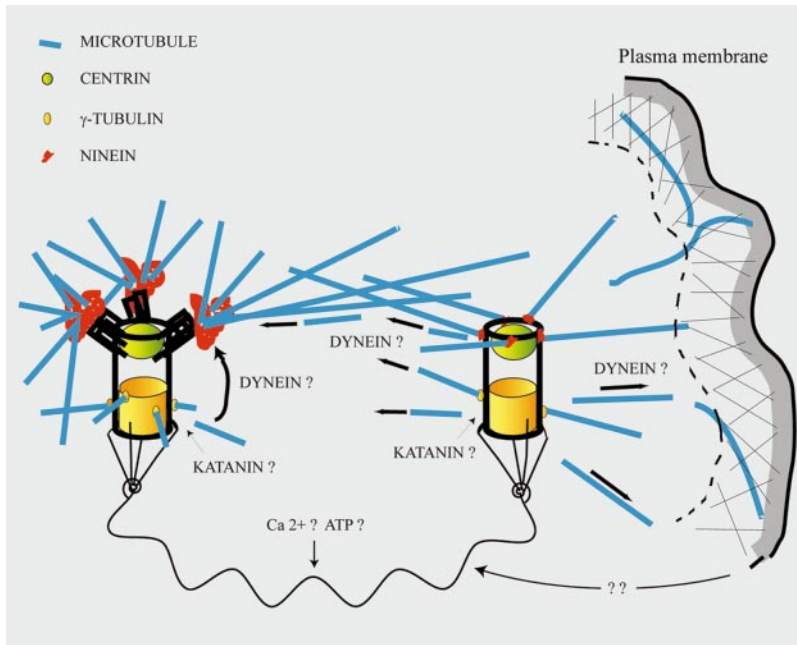
The centering of the mother centriole depends, however, on its Mt-anchoring activity. When Mts were completely depolymerized over several hours, the immotile centriole could be eventually found away from the cytoplast center. The centering capacity of an aster of Mts nucleated either from a bead bearing Mt seeds, or from isolated centrosomes, has been demonstrated *in vitro* in an artificial cell (Dogterom et al., 1995; Holy et al., 1997). We show here that *in vivo* the centering ability of the centrosome-Mts system relies on the mother centriole only and on its Mt-anchoring activity. In agreement with this conclusion, we observed that the motile centriole, even when alone in a cytoplast, was never located at the cell center.

The characteristic ninein staining of the mother centriole (see Fig. 6) might correspond to sub-distal appendages of the mother centriole (see Bouckson-Castaing et al., 1996, and unpublished observations). Independent arguments for a role of the sub-distal appendages in anchoring Mts was previously proposed (De Brabander, 1982; Gorgidze and Vorobjev, 1995). A role of ninein in mediating the anchoring of Mts to the apical plasma membrane in cochlear epithelial cells has been recently demonstrated during the postnatal differentiation of the mouse inner ear (Mogensen et al., 1999). Whether or not ninein is directly interacting with Mts as yet to be established.

**The Release and Capture Model and the Regulation of Release Versus Capture by Centriole Splitting.** All the data presented in this work, particularly the strikingly different Mt arrays observed in cytoplasts containing either the mother or the daughter centriole (see Fig. 8), can be accounted for by the working model depicted in Fig. 10. It proposes that Mts are nucleated near centrioles (Fig. 7 B), then released and transported either to the ninein-containing complexes associated with the mother centriole or to other anchoring sites, mainly near or at the plasma membrane. Released Mts would be transported by dynein motors for example, as it was shown that perturbing dynactin activity greatly disturbed the organization of the Mt array. It has also been proposed that the dynein/dynactin complex could have a role in anchoring the Mts at the centrosome (Clark and Meyer, 1999; Quintyne et al., 1999) and in the centrosome interaction with the cell cortex (Koonce et al., 1999). An important feature of this model is that the intercentriolar distance, which might itself be dependent on peripheral motility (see below), would regulate the release versus centrosomal capture balance of Mts within the cell.

The release and capture model, first proposed by De Brabander (1982), was recently revived as a possible mechanism for understanding the redistribution of Mts away from the centrosome in highly polarized epithelial cells of the cochlea (Mogensen et al., 1997). The release of Mts in the cytoplasm, first proposed by Vorobjev and Nadezhdina (1987), has been a matter of debate (for a review, see Keating and Borisy, 1999). The Mt release from the centrosome seems to be an active process, mediated by the severing protein katanin (McNally et al., 1996; Ahmad et al., 1999). As katanin seems to be active throughout cytoplasm, the major way to control the Mt array would be to control the anchoring and stabilizing activities.

Calcium-dependent regulation of the centrosome matrix (Baron et al., 1994; Paintrand et al., 1992) could be a way for the cell to reorganize its Mt array. When the matrix would be condensed by an appropriate mechanism, most of the nucleated Mts would be able to anchor on the mother centriole (Fig. 7 B, top), whereas when the matrix



**Figure 10.** A model for the role of each centriole in the centrosome. The model proposes that Mts are nucleated near centriole walls, then released and transported either to the ninein-containing complexes associated with the mother centriole or to other anchoring sites, mainly near or at the plasma membrane. An important feature of this model is that the intercentriolar distance, which might itself be dependent on peripheral acto-myosin activity, would regulate the release of Mts to the cell periphery. These Mts being then involved in peripheral processes, the control of the intercentriolar distance would provide a feed-back loop for the regulation of the cortical acto-myosin system. The link between both centrosomes is probably composed of many different proteins usually found in the PCM, and its overall length could be calcium dependent. The maturation-dependent anchoring of the centrosome organelle in the cytoplasm is not represented.

would be extended, released Mts could be transiently captured by capping elements at the cell periphery (Fig. 7 B, bottom). We must stress that the time course of daughter centriole excursion at the cell periphery (up to 15 min; see Fig. 4) is sufficient to release a number of Mts.

From the extensive data on fixed cells from various cell lines in the literature, one can observe that there is often a correlation between the extent of centriole splitting and the amount of Mts involved in the aster. All cell lines in which most of the Mts are participating in the aster, such as PtK1, CV1, COS, have two centrioles near one another at the center of the aster. Another way to control Mt organization in differentiated cells could be to redistribute anchoring proteins from the centrosome to other sites (Mogensen, 1999; Mogensen et al., 1999).

### Perspectives

The implication of the centrosome in cell motility is controversial as it has been shown that pieces of different kinds of cells can polarize and migrate (Malawista et al., 1983; Euteneuer and Schliwa, 1984; Verkhovsky et al., 1999). However, if an acto-myosin cortical system is able to polarize and drive a piece of cell, it is not clear whether it is capable of integrating conflicting gradients. A cell often grows several lamellipodia suggesting that the peripheral acto-myosin system is not able to impose a unified polarity which is essential for cell integrity (the whole cell must go in the same direction). This problem of course would be expected to become more crucial as cell size increases. One may note, for example, that in small amoeba cells, like *Dyctostelium*, the centrosome has a unique core structure rather than two, the repositioning of which seems to stabilize a pseudopodial extension and thus the direction of cell movement (Ueda et al., 1997). The two centrioles-centrosome might thus be necessary for coordinating the Mt array in large cells with the activity of the cortical actin. A centrally organized aster of stable Mts

might be necessary for stabilizing the cell compartments and the nucleus with respect to the newly acquired position, whereas a more peripheral subset of released and transient Mts might be necessary for exploring a new step in locomotion. It is known, for example, that actin-dependent pseudopodial activity must be either stabilized by, or at least that it is somehow dependent on, peripheral Mts (Nathke et al., 1996; Schliwa et al., 1999).

Another situation in which the specific activity of each centriole might be required is cytokinesis during which a peculiar behavior of the centrosome organelle has been observed (Mack and Rattner, 1993). The data presented in this work strongly suggests a specific function of centriole splitting for completion of the division process (see Fig. 2). At the end of telophase, a rapid ( $\sim 10 \mu\text{m}/\text{min}$ ) and persistent movement of one of the two centrioles towards the mid-body takes place in one sister cell or in both, although at different moments. This phenomenon is currently under study.

In conclusion, our work reveals an unexpected complexity in the behavior of the centrosome. The analysis of the centriole movements and of the effect of cytoskeletal drugs has implications for the integration of the centrosome organelle within the cell. A specific role for each centriole in the Mt organizing activity of the centrosome is also demonstrated, which strongly suggests that centriole splitting could be a way to control the cellular array of Mts. This could have important implications for understanding how the centrosome activity and the plasma membrane activity could be coupled with each other during cell locomotion or cell division.

We thank Jan de Mey and Jean-Baptiste Sibarita for the setting of the video recording device which was very helpful; Olivier Cardoso and Virginie Enselem for helpful discussions on the analysis of the centriole movements; Andrew Matus for well-advised commentaries on this work; Yann Abraham for the GFP constructs and Claude Celati for her help in the cloning of stable cell lines; Bruno Goud and Ludger Johannes for the

Shiga toxin B fragment; and Anne-Marie Tassin, Guy Keryer, Bruno Goud, Andrew Matus, and Don Cleveland for critical reading of the manuscript.

This work is supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Curie, Direction des Recherches, Etudes et Techniques and Association pour la Recherche sur le Cancer. It was also supported, in part, by the National Institute of Health grants GMS R01 59363 to A. Khodjakov and GMS R01 40198 to C.L. Rieder.

Submitted: 21 December 1999

Revised: 28 February 2000

Accepted: 2 March 2000

## References

- Ahmad, F.J., W. Yu, F.J. McNally, and P.W. Baas. 1999. An essential role for katanin in severing Mts in the neuron. *J. Cell Biol.* 145:305–315.
- Andersen, S.S.L. 1999. Molecular characteristics of the centrosome. *Int. Rev. Cytol.* 187:51–109.
- Baron, A.T., T.M. Greenwood, C.W. Bazinet, and J.L. Salisbury. 1992. Centrin is a component of the pericentriolar lattice. *Biol. Cell.* 76:383–388.
- Baron, A.T., V.J. Suman, E. Nemeeth, and J.L. Salisbury. 1994. The pericentriolar lattice of PtK2 cells exhibits temperature and calcium-modulated behavior. *J. Cell Sci.* 107:2993–3003.
- Bobinnec, Y., A. Khodjakov, L.M. Mir, C.L. Rieder, B. Edde, and M. Bornens. 1998. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 143:1575–1589.
- Bornens, M. 1977. Is the centriole bound to the nuclear membrane? *Nature.* 270:80–82.
- Bornens, M., M. Paintrand, J. Berges, M.C. Marty, and E. Karsenti. 1987. Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motil. Cytoskelet.* 8:238–249.
- Bouckson-Castaing, V., M. Moudjou, D.J.P. Ferguson, S. Mucklow, Y. Belkaid, G. Milon, and P.R. Crocker. 1996. Molecular characterisation of ninein, a new coiled-coil protein of the centrosome. *J. Cell Sci.* 109:179–190.
- Carter, S.B. 1967. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature.* 213:261–264.
- Chretien, D., B. Buendia, S.D. Fuller, and E. Karsenti. 1997. Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *J. Struct. Biol.* 120:117–133.
- Clark, I.B., and D.I. Meyer. 1999. Overexpression of normal and mutant Arp1(alpha)(centractin) differently affects Mt organisation during mitosis and interphase. *J. Cell Sci.* 112:3507–3518.
- De Brabander, M. 1982. A model for the Mt organising activity of the centrosomes and kinetochores in mammalian cells. *Biol. Intl. Reports.* 6:901–915.
- Dogterom, M., A.C. Maggs, and S. Leibler. 1995. Diffusion and formation of Mt asters: physical processes versus biochemical regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6683–6688.
- Esprefaco, E.M., D.E. Coling, V. Tsakraklides, K. Krogh, J.S. Wolenski, G. Kalinec, and B. Kachar. 1998. Localization of myosin-V in the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8636–8641.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa. 1984. Persistent and directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of Mts. *Nature.* 310:58–61.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa. 1985. Evidence for an involvement of actin in the positioning and motility of centrosomes. *J. Cell Biol.* 101:96–103.
- Fais, D., E.S. Nadezhkina, and Iu.S. Chentsov. 1984. Evidence for the nucleus-centriole association in living cells obtained by ultracentrifugation. *Eur. J. Cell Biol.* 33:190–196.
- Gorgidze, L.A., and I.A. Vorobjev. 1995. Centrosome and Mts behavior in the cytoplasts. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 27:381–389.
- Holy, T.E., M. Dogterom, B. Yürke, and S. Leibler. 1997. Assembly and positioning of Mt asters in microfabricated chambers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:6228–6231.
- Karsenti, E., S. Kobayashi, T. Mitchison, and M. Kirschner. 1984. Role of the centrosome in organizing the interphase Mt array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *J. Cell Biol.* 98:1763–1776.
- Keating, T.J., and G.G. Borisy. 1999. Centrosomal and non-centrosomal Mts. *Biol. Cell.* 91:321–329.
- Kochanski, R.S., and G.G. Borisy. 1990. Mode of centriole duplication and distribution. *J. Cell Biol.* 110:1599–1605.
- Koonce, M.P., J.K. Köhler, J. Schwartz, I. Tikhonenko, and G. Gerish. 1999. Dynein motor regulation stabilizes interphase Mt arrays and determines centrosome position. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 18:6786–6792.
- Kuriyama, R., and G.G. Borisy. 1981. Centriole cycle in chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J. Cell Biol.* 91:

814–821.

- Lange, B.M., and K. Gull. 1995. Molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J. Cell Biol.* 130:919–927.
- Mack, G., and Rattner, J.B. 1993. Centrosome repositioning immediately following karyokinesis and prior cytokinesis. *Cell Motil. Cytoskelet.* 26:239–247.
- Malawista, S.E., A. de Boisfleury-Chevance, R. Maunoury, and M. Bessis. 1983. Heat as a probe of centrosomal function: a phase-contrast and immunofluorescent study of human blood monocytes. *Blood Cells.* 9:443–453.
- Mallard, F., C. Anthony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. 1998. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of Shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol.* 143:973–990.
- McNally, F.J., K. Okawa, A. Iwamatsu, and R.D. Vale. 1996. Katanin, the Mt-severing ATPase, is concentrated at centrosomes. *J. Cell Sci.* 109:561–567.
- Middendorp, S., A. Paoletti, E. Schiebel, and M. Bornens. 1997. Identification of a new mammalian centrin gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:9141–9146.
- Middendorp, S., T. Küntziger, Y. Abraham, S. Holmes, N. Bordes, M. Paintrand, A. Paoletti, and M. Bornens. 2000. A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J. Cell Biol.* 148:405–416.
- Mogensen, M.M., A. Malik, V. Bouckson-Castaing, and M. Bornens. 1999. Microtubule release and capture and the role of the centrosomal protein ninein. *Mol. Biol. Cell.* 10(Suppl.):257a.
- Mogensen, M.M. 1999. Mt release and capture in epithelial cells. *Biol. Cell.* 91:331–341.
- Mogensen, M.M., J.B. Mackie, S.J. Doxsey, T. Stearns, and J.B. Tucker. 1997. Centrosomal deployment of gamma-tubulin and pericentrin: evidence for a Mt-nucleating domain and a minus-end docking domain in certain mouse epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskelet.* 36:276–290.
- Moudjou, M., N. Bordes, M. Paintrand, and M. Bornens. 1996. Gamma-tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J. Cell Sci.* 109:875–887.
- Nathke, I.S., C.L. Adams, P. Polakis, J.H. Sellin, and W.J. Nelson. 1996. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J. Cell Biol.* 134:165–179.
- Paintrand, M., M. Moudjou, H. Delacroix, and M. Bornens. 1992. Centrosome organization and centriole architecture: their sensibility to divalent cations. *J. Struct. Biol.* 108:107–128.
- Paoletti, A., M. Moudjou, M. Paintrand, J.L. Salisbury, and M. Bornens. 1996. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.* 109:3089–3102.
- Prescott, D.M., D. Myerson, and J. Wallace. 1972. ENUcleation of mammalian cells with cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* 71:480.
- Quintyne, N.J., S.R. Gill, D.M. Eckley, C.L. Crego, D.A. Compton, and T.A. Schroer. 1999. Dynactin is required for Mt anchoring at centrosomes. *J. Cell Biol.* 147:321–334.
- Rieder, C.L., and G.G. Borisy. 1982. The centrosome cycle in PtK2 cells: asymmetric distribution and structural change in the pericentriolar material. *Biol. Cell.* 44:117–132.
- Rieder, C.L., and G. Cassels. 1999. Correlative light and electron microscopy of mitotic cells in monolayer cultures. *Methods Cell Biol.* 61:297–315.
- Schliwa, M., U. Euteneuer, R. Graf, and M. Ueda. 1999. Centrosomes, Mts and cell migration. *Biochem. Soc. Symp.* 65:223–231.
- Schnackenberg, B.J., and R.E. Palazzo. 1999. Identification and function of the centrosome centromatrix. *Biol. Cell.* 91:429–438.
- Sluder, G., and C.L. Rieder. 1985. Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles. *J. Cell Biol.* 100:887–896.
- Sluder, G., F.J. Miller, and C.L. Rieder. 1989. Reproductive capacity of sea urchin centrosomes without centrioles. *Cell Motil. Cytoskelet.* 13:264–273.
- Tassin, A.M., and M. Bornens. 1999. Centrosome structure and Mt nucleation in animal cells. *Biol. Cell.* 91:343–354.
- Tassin, A.M., C. Celati, M. Moudjou, and M. Bornens. 1998. Characterization of the human homologue of the yeast Spc98p and its association with gamma-tubulin. *J. Cell Biol.* 141:689–701.
- Tsakraklides, V., K. Krogh, L. Wang, J.C.S. Bizario, R.E. Larson, E.M. Esprefaco, and J.S. Wolenski. 1999. Subcellular localization of GFP-myosin-V in live mouse melanocytes. *J. Cell Sci.* 112:2853–2865.
- Ueda, M., R. Graf, H.K. MacWilliams, M. Schliwa, and U. Euteneuer. 1997. Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:9674–9678.
- Verkhovskiy, A.B., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 1999. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr. Biol.* 9:11–20.
- Vorobjev, I.A., and Y.S. Chentsov. 1982. Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *J. Cell Biol.* 98:938–949.
- Vorobjev, I.A., and E.S. Nadezhkina. 1987. The centrosome and its role in the organization of Mts. *Int. Rev. Cytol.* 106:227–293.
- Vorobjev, I.A., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 1997. Cytoplasmic assembly of Mts in cultured cells. *J. Cell Sci.* 110:2635–2645.





### **III. DISCUSSION :**

#### **1. Quelques critiques**

La principale critique que je formulerais sur ce travail est celle que j'ai formulé à de nombreuses reprises déjà envers d'autres études : ne pas avoir abordé suffisamment de systèmes différents, et en particulier ne pas avoir utilisé de cellules à migration dirigée (douées de chimiotactisme principalement).

Un autre problème qui a été soulevé à diverses reprises lors de discussions est celui de la transformation des cellules utilisées, qui serait à l'origine de la séparation précoce des centrioles et donc de la liberté de mouvement du centriole fils. Il me semble qu'il y a deux réponses à donner : premièrement, répondre à l'étonnement de ceux qui ne voient que très rarement les centrioles séparés dans les cellules qu'ils étudient. Il faut bien préciser que le centriole fils n'est pas en permanence en train de gigoter à travers la cellule, mais qu'il s'éloigne seulement transitoirement du centriole parental. Cela n'a peut-être pas été assez souligné dans la discussion du papier. C'est surtout frappant dans les cellules HeLa, qui ne sont en général pas motiles et ont alors leurs deux centrioles proches l'un de l'autre. Quelques cellules qui ne sont pas dans des clones adoptent parfois la forme allongée des cellules en migration. Dans ce cas, les deux centrioles sont parfois très séparés (mais toujours transitoirement). Ce travail est donc encore préliminaire, en ce qu'il n'exploite pas toutes les possibilités de démonstration d'une corrélation entre la motilité et la séparation des centrioles. Cependant, cette corrélation a été remarqué de nombreuses fois et dans des systèmes variés, incluant des cellules différenciées (Schliwa et al., 1983; Schliwa et al., 1982).

On n'a pas non plus assez exploité les différences existant d'une cellule à l'autre dans la même culture. En effet, il y a toujours des cellules mobiles et des cellules moins mobiles dans une population de cellules migrant aléatoirement. Il était intéressant de constater que cette hétérogénéité existe aussi dans l'intensité du mouvement du centriole fils (c'est ce qui donne

une motilité en moyenne seulement deux fois plus élevée que celle du père, alors que quand il est motile, le centriole fils peut être transitoirement très rapide). Cette hétérogénéité a été observée en absence de noyau et donc en absence de migration de la cellule. Cela nous avait amené à postuler que les cellules qui étaient énucléées alors qu'elles étaient très motiles donnaient des cytoplastes dans lesquels l'état du centriole fils restait le même. Cette hypothèse qui aurait pu suggérer l'existence d'une régulation de l'état du centriole fils (séparé et actif ou pas séparé), n'a pas été démontrée. Il suffirait de filmer des cellules sur une grille puis de les énucléer en espérant qu'elles ne se déplacent pas trop dans le temps de l'énucléation puis d'étudier la motilité du centriole de ces cellules.

La deuxième réponse concerne l'étonnement que peut susciter une séparation des centrioles très tôt en G1. Il faut tout d'abord bien préciser que toutes les études du cycle de duplication du centrosome réalisées en microscopie électronique indiquent une désorientation des deux centrioles en tout début de G1 (Kuriyama and Borisy, 1981a; Vorobjev and Chentsov Yu, 1982), voire en télophase, contrairement à ce qu'indiquent un bon nombre de revues qui citent pourtant ces mêmes références. J'ai déjà discuté dans l'introduction de la différence entre désorientation et séparation. Il ne me semble pas qu'il faille faire une distinction. De plus, tout le débat sur ce sujet repose sur la question de l'initiation de la duplication et du facteur qui permettrait à une nouvelle duplication d'avoir lieu. Or, les cellules utilisées dans ce travail ne commencent à dupliquer leur centrioles qu'à la transition G1/S, environs 10 heures après la séparation de leurs centrioles, et par conséquent au même moment que les lignées dans lesquelles les centrioles ne se séparent pas. Un des travaux qui a suggéré un lien entre la séparation des centrioles et l'initiation de leur duplication montrait une corrélation, lors de la stimulation de cellules quiescentes par des facteurs mitogéniques, de la séparation des centrioles et du début de la réplication de l'ADN (Mascardo and Sherline, 1982; Sherline and Mascardo, 1982a ; Sherline and Mascardo, 1984). Cependant, ces mêmes auteurs ont pu

mettre en évidence une induction du splitting indépendante de l'entrée en phase S (Sherline and Mascardo, 1982b).

Il a récemment été montré dans un système équivalent d'induction de la polarité cellulaire par wound healing dans un tapis de cellules quiescentes que le facteur qui induit la polarisation des cellules est le LPA et non pas les facteurs de croissance (Palazzo et al., 2001). Or cette polarisation a souvent été corrélée à une séparation des centrioles, même dans des cellules différenciées, donc encore une fois indépendamment du cycle cellulaire. Ainsi, même dans les expériences de Mascardo et al., on pourrait imaginer qu'il y aie un biais de cette nature. On peut aussi penser qu'il y a deux voies d'activation de la séparation des centrioles, celles qui activent la motilité et celles qui activent la réplication de l'ADN (il faut noter que chez Mascardo et al., les distances observées sont de l'ordre du micron, alors que dans les expériences de motilité, les distances intercentriolaires peuvent atteindre plus de 10 microns). Enfin, il a été suggéré que la séparation précoce des centrioles soit liée à la lignée cellulaire utilisée, L929, qui aurait, d'après un travail qui date d'il y a presque trente ans (Phillips and Rattner, 1976), la particularité de dupliquer ses centrioles en G1. Tout d'abord, ce papier affirme que des figures de duplication peuvent être aperçues 4h après la mitose, or la séparation a lieu en telophase. Ensuite, dans nos mains, il n'y a pas une seule figure de duplication dans les huit heures qui suivent un 'mitotic shake off'. Cela peut être estimé grâce à la protéine centrine, qui est un marqueur très précoce des procentrioles (l'hypothèse a même été avancée que ce marqueur précède l'assemblage des microtubules qui seul est visible en microscopie électronique, Paoletti et al., 1996). Il a été vérifié par analyse au FACS que huit heures après un 'mitotic shake off', les cellules L929 entrent en phase S (et même un peu plus tôt). Ces techniques n'étaient pas disponibles à l'époque et nous faisons plus confiance à nos résultats. De plus, dans des cellules L929 énucléées par centrifugation jusqu'à huit heures après la mitose, les centrioles ne se dupliquent jamais. Au contraire, si les cytoplastes sont

produits à partir de cellules synchronisées à la bordure G1/S par un double blocage à la thymidine, les centrioles, qui ont souvent déjà un petit bourgeon à ce stade, sont complètement dupliqués dix heures plus tard. Enfin, la séparation des centrioles en télophase et transitoirement tout au long de la phase G1 a été observée, par nous et par d'autres, dans de nombreux types cellulaires : HeLa, 3T3, C2C12, HFF11 (une lignée primaire), U2OS entre autres. Un tel comportement n'a pas été observé sur les cellules PtK (qui ne bougent pas).

Il semble donc que les résultats présentés dans le papier 1 ne soient pas un artefact dû à la transformation des cellules. Il semble aussi qu'il faille trouver une autre hypothèse quant à l'évènement centriolaire à l'origine de la duplication des centrioles.

On pourrait aussi s'inquiéter de la surexpression de la centrine qui, dans certaines cellules, forme des fibres contractiles et qui pourrait donc modifier la motilité des centrioles. Nous avons utilisé la centrine 1 et non la 2 ou la 3, couplée à la GFP, parce que c'est la seule centrine, dans nos mains, qui a permis d'établir systématiquement des lignées stables sans aucun phénotype apparent, alors que la surexpression des centrines 2 et 3 couplées à la GFP semble entraîner la mort cellulaire à plus ou moins long terme (plusieurs tentatives pour établir une lignée stable surexprimant ces protéines se sont soldées par des échecs, plus aucune cellule positive n'étant détectée après quelques jours de sélection). Il faut noter que les centrines 2 et 3 sont ubiquitaires, alors que la centrine 1 est exprimée spécifiquement dans les testicules et dans les épithéliums ciliés (mais pas pendant la phase proliférative). Il est possible qu'elle ait un rôle dans la motilité de l'axonème mature (Laoukili et al., 2000). Ainsi, elle se localiserait correctement dans les cellules utilisées, mais sa surexpression n'aurait aucun effet, car ses effecteurs seraient absents. De plus, l'observation des centrioles à l'aide d'anticorps dans des lignées contrôles, montre qu'il y a toujours un certain nombre de cellules dont les centrioles sont séparés.

Enfin, il aurait été intéressant de tester le rôle des moteurs moléculaires dynéine et kinésine dans le mouvement du centriole fils (bien que celui-ci dépende principalement du système acto-myosique).

## **2. Comment reformuler la question et quel système expérimental utiliser**

### **- Ce qu'apporte ce travail**

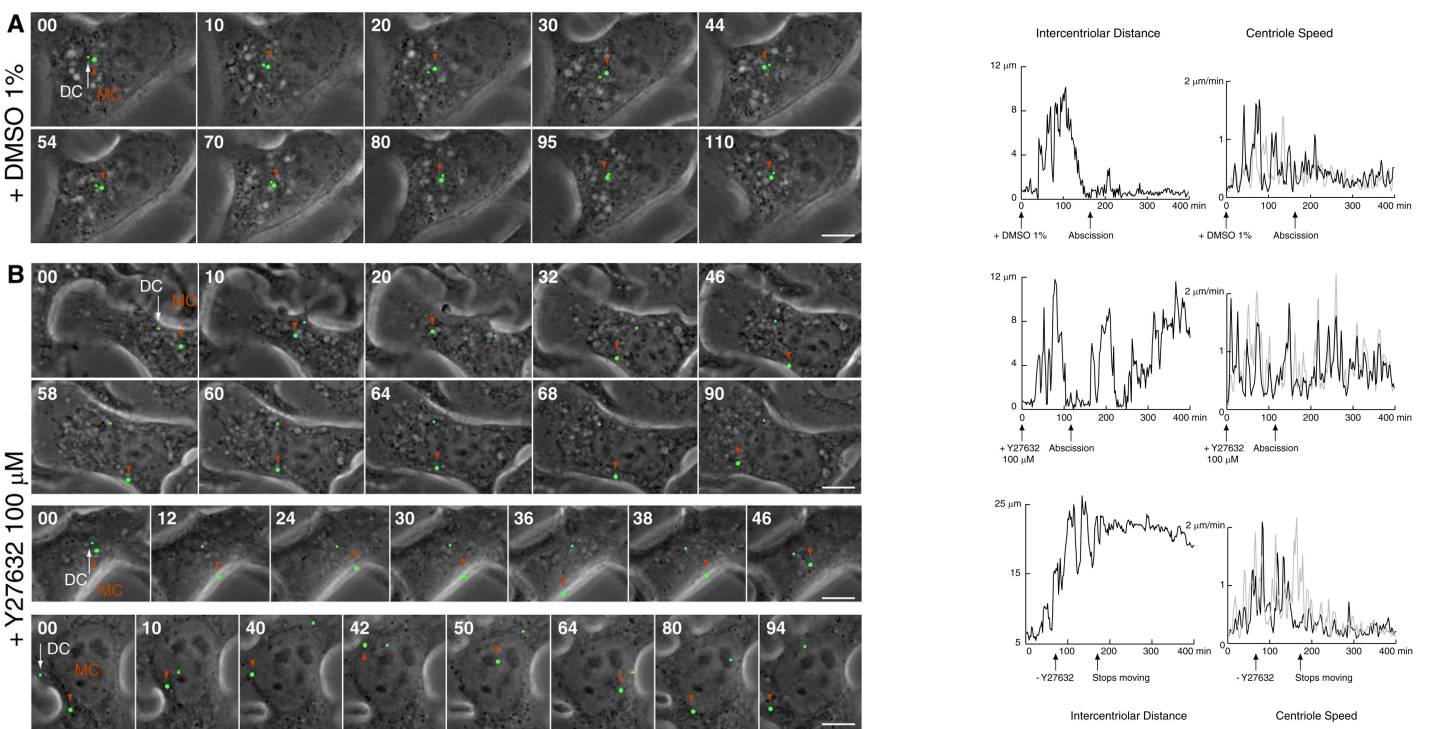
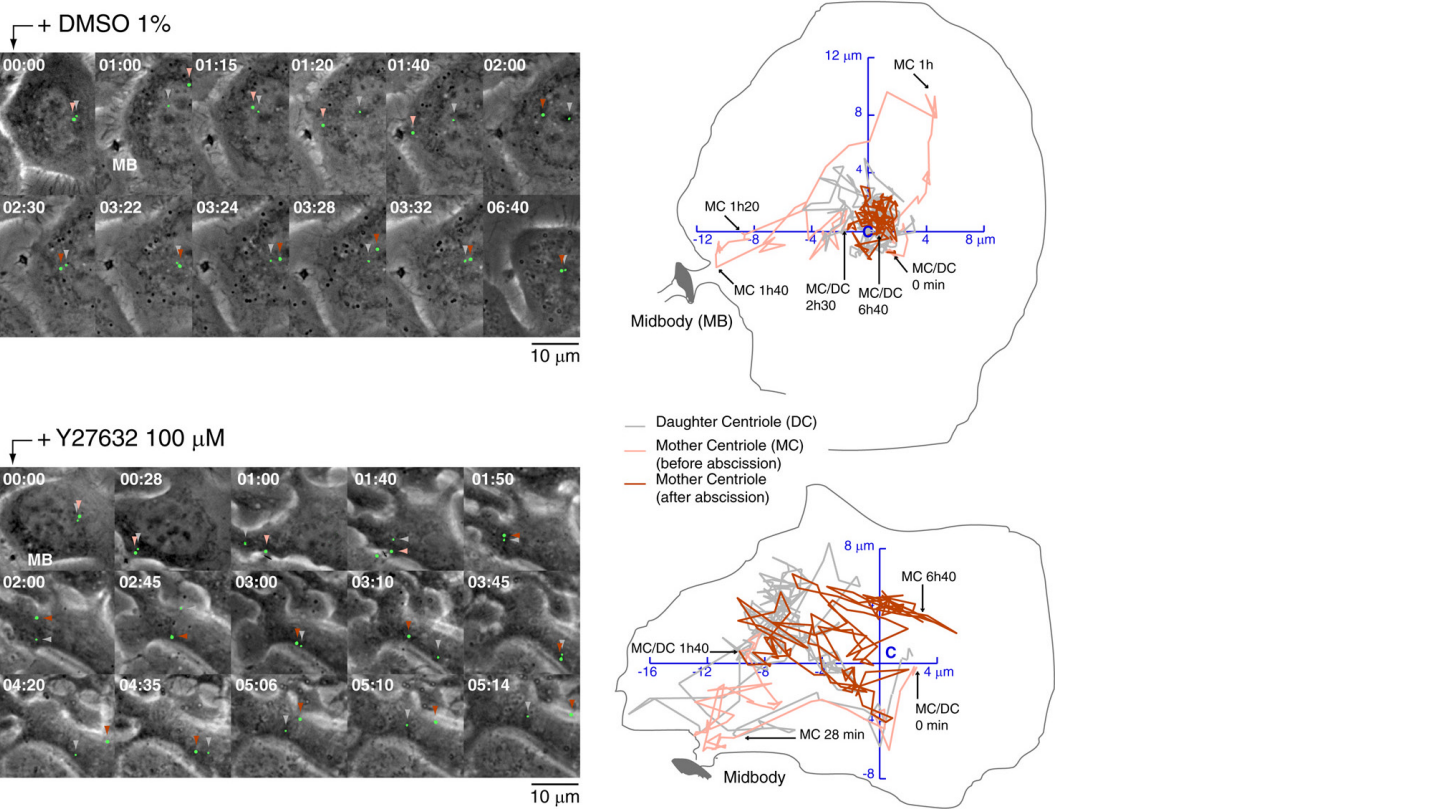
Les travaux présentés dans le papier 1 sont originaux sous plusieurs angles.

Tout d'abord, ils montrent clairement que dans les cellules étudiées, le véritable centrosome est le centriole parental. Il ancre les microtubule et reste proche du centroïde de la cellule.

Le fait que le mouvement du fils soit principalement relié à l'activité du système acto-myosique est aussi original, car la plupart des publications attribuent en général le positionnement du centrosome aux microtubules. Cette particularité du mouvement du centriole fils suggère une fonction différente de celle habituellement attribuée au repositionnement du centrosome (ou du MTOC), qui est en fait le centriole parental.

Ce travail indique une autre différence fonctionnelle entre les deux centrioles : leurs capacités différentes de liaison aux microtubules. Jusqu'à présent, l'association prédominante du centriole père aux microtubules, décrite souvent à l'aide de la microscopie électronique, était attribuée à une plus grande capacité de nucléation. Nous montrons ici que c'est la capacité d'ancrage qui est différente, et nous proposons que cela soit lié à la présence de la protéine ninéine sur les appendice sub-distaux du centriole parental (voir aussi le papier 3 présenté en annexe).

Enfin, nous suggérons que les deux centrioles soient ancrés différemment dans le cytoplasme, indépendamment des microtubules. En effet, lorsque ceux-ci sont dépolymérisés, le centriole fils continue d'être animé transitoirement de mouvements de grande amplitude, alors que le centriole parental ne s'excentre que très lentement (au bout de plusieurs heures).

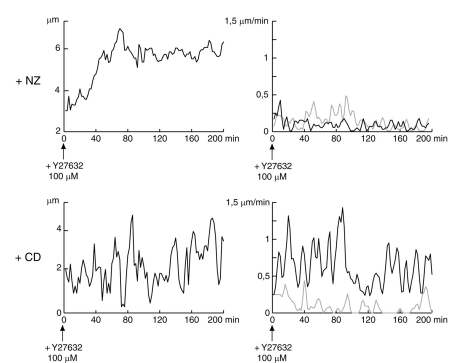


### Figure 45: p160 ROCK régule la distance intercentriolaire et le centrage du centriole parental

La figure du haut montre, dans une cellule contrôlée et dans une cellule traitée, le comportement du centriole parental (MC) après l'abscission.

Sur la droite ont été tracées les trajectoires des centrioles, ramenées au centroïde de la cellule (C), à chaque image. La figure du bas montre le comportement des centrioles (fils: DC et père: MC) dans des cellules en G1.

Les graphes de droite montrent la distance intercentriolaire, ou la vitesse des centrioles (gris: fils et noir: père) dans différentes conditions.



**- Suite 1 : Régulation de la dynamique du centrosome par p160ROCK (soumis pour publication)**

(Véronique Chevrier, Matthieu Piel, Nora Collomb, Yasmina Saoudi, Ronald Frank, Michel Paintrand, Shuh Narumiya, Michel Bornens et Didier Job)

La protéine Rho est une GTPase de la famille Ras (pour une revue voir Aspenstrom, 1999). C'est un facteur important de signalisation intracellulaire qui induit la formation de fibres de stress et régule la contraction du cortex cellulaire en activant une kinase qui a pour effecteur la chaîne légère de la myosine II : la p160 ROCK (Amano et al., 1997 ; pour une revue voir Amano et al., 2000).

Véronique Chevrier et Didier Job ont identifié, à partir de plusieurs anticorps reconnaissant spécifiquement des peptides indépendants, un enrichissement au centrosome de la p160 ROCK ainsi que d'un variant. Ces protéines se localisent spécifiquement sur le centriole parental et sur le lien intercentriolaire. Nous avons étudié, à la fois de manière statistique sur des cellules fixées et en vidéomicroscopie, l'effet sur le centrosome d'un inhibiteur spécifique de la kinase p160 ROCK, Y-27632 (utilisé entre 10 et 100  $\mu$ M).

Il y a principalement deux types d'effets : un effet sur la distance intercentriolaire qui est très largement augmentée, et un effet sur le centrage du centriole parental qui, au lieu de garder sa position près du centroïde de la cellule, devient très mobile. Dans les cellules traitées, il est fréquemment localisé au niveau de la membrane plasmique, le long de laquelle il fait des aller-retours (voir la figure 45).

Comme un mouvement du centriole parental avait été observé en fin de mitose (voir papier 2), nous avons étudié l'effet de l'inhibition de p160 ROCK à ce moment du cycle cellulaire. Quand des cellules sont traitées avec l'inhibiteur une heure après une synchronisation en mitose par 'mitotic shake off' (voir papier 2), le centriole se déplace normalement vers le



cortex, au niveau du midbody et l'abscission se produit comme dans les cellules non traitées. Mais, au lieu de regagner le centre de la cellule, le centriole parental continue à se déplacer à la même vitesse et souvent le long de la membrane plasmique. Cette effet de décentrage du centriole parental a lieu aussi quand des cellules en G1 plus tardif sont traitées avec l'inhibiteur de p160 ROCK.

L'inhibition de p160ROCK a un effet important sur la morphologie cellulaire, lié au rôle de cette kinase dans la régulation de l'assemblage des fibres de stress. Nous avons donc dépolymérisé les microfilaments en traitant les cellules à la cytochalasine D. Ce traitement n'affecte pas le comportement du centriole père en présence de Y-27632, contrairement à une dépolymérisation des microtubules qui inhibe totalement son mouvement. Cela suggère un effet de la drogue sur la régulation de l'ancrage des microtubules par le centriole parental, mais nous n'avons pas pu le mettre directement en évidence, car il est très difficile d'observer le relargage des microtubules.

Nous concluons qu'il y a un effet spécifique de l'inhibiteur sur le centrosome, qui révèle une fonction potentielle de p160ROCK dans la régulation de la dynamique du centrosome, la localisation au niveau du centriole parental et au niveau du lien intercentriolaire coïncidant bien avec les deux types de phénotypes observés (séparation des centrioles et décentrage du centriole parental). Une corrélation entre la régulation de la distance intercentriolaire et celle de la localisation du centriole parental vient s'inscrire naturellement dans le modèle de travail que nous avons proposé pour l'action du centrosome dans la motilité cellulaire :

- 1) séparation des centrioles, le centriole fils étant déplacé vers les zones d'activité corticale dans lesquelles il nucléé des microtubules libres.
- 2) le centriole parental est tiré vers la zone d'activité, entraînant avec lui le noyau.

Il reste néanmoins deux points à éclaircir : quelle est la nature de l'isoforme centrosomienne de la p160ROCK ? Peut-on complètement exclure un effet indirect de l'inhibition de p160

ROCK sur la dynamique du centrosome ? Si oui, quelle est l'effecteur de p160 ROCK au centrosome ?

**- Suite 2 : Importance du relargage des microtubules dans la motilité des fibroblastes de vertébré (en préparation).**

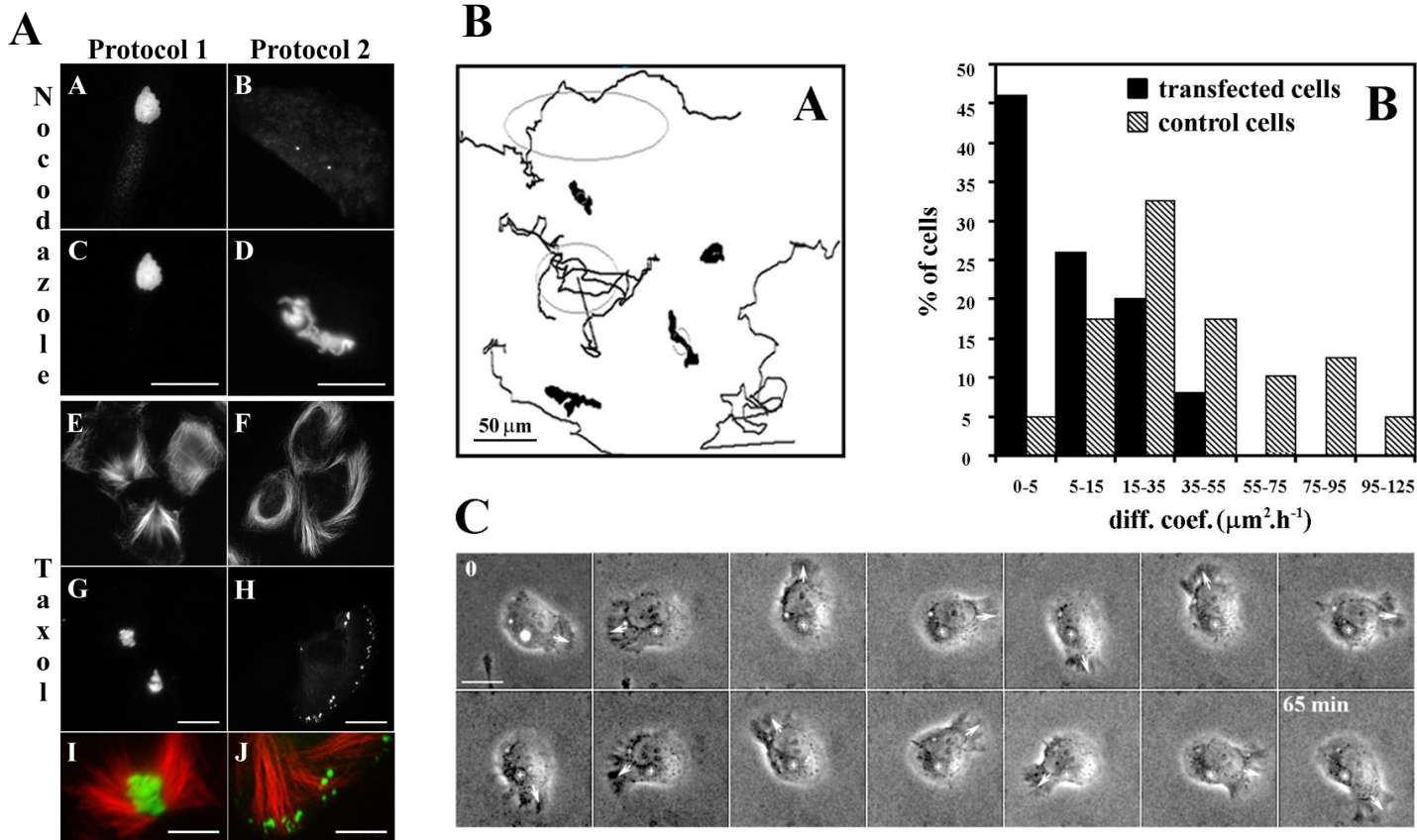
(Miguel Abal, Matthieu Piel, Véronique Boucson-Castaing, Anne-Marie Tassin, Mette Mogensen et Michel Bornens)

Les travaux présentés dans les papiers 1 et 3 (en annexe) suggèrent un rôle important de la ninéine dans l'ancrage des bouts moins des microtubules. D'après le modèle présenté dans le papier 1, l'ancrage différentiel des microtubules sur le centriole fils et sur le centriole père suggère un mécanisme pour réguler la quantité de microtubules libres dans la cellule en faisant varier la distance intercentriolaire. Quand les deux centrioles sont proches, presque tous les microtubules sont ancrés sur le centriole parental. En revanche, s'ils sont éloignés, des microtubules peuvent être relâchés à proximité du cortex et participer à la stabilisation d'un lamellipode.

Par ailleurs, G.G. Borisy et ses collaborateurs ont pu démontrer dans une série de travaux l'importance du relargage des microtubules dans la dynamique globale du réseau (Keating and Borisy, 1999; Keating et al., 1997; Rodionov et al., 1999; Vorobjev et al., 1999, voir aussi Yvon and Wadsworth, 1997). Cette dynamique a par ailleurs à plusieurs reprises été suspectée de jouer un rôle important dans la motilité cellulaire (voir dans l'introduction au papier 1, le chapitre sur le rôle des microtubules dans la motilité cellulaire).

Nous avons étudié l'effet de la surexpression de la ninéine sur l'organisation des microtubules et sur la motilité cellulaire (voir la figure 46).

La ninéine surexprimée s'accumule autour du centrosome sous forme d'une masse qui peut atteindre une taille de plusieurs microns de diamètre. Elle s'accumule aussi au niveau du



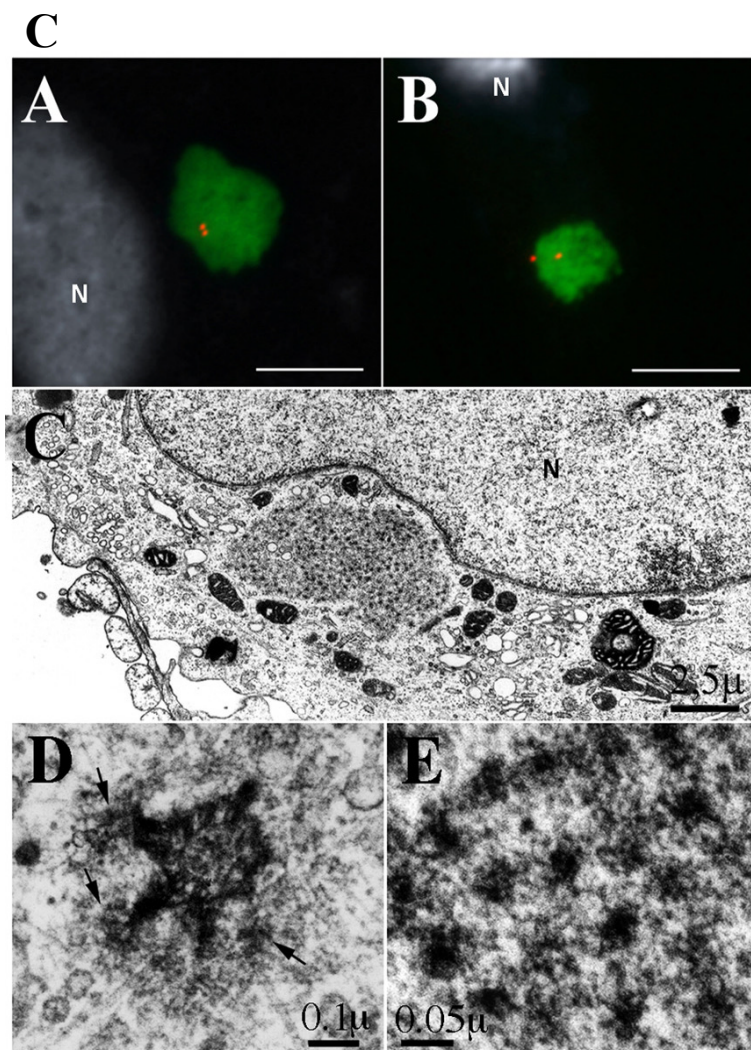
### Figure 46: Une surexpression de la Ninéine inhibe le relargage des microtubules et perturbe la motilité cellulaire

La ninéine couplée à la GFP a été surexprimée dans des cellules fibroblastiques.

A: Effet de drogues affectant les microtubules quand elles sont appliquée dès le début de l'expression (protocole 2) ou après 24h heures (protocole 1). Noter que tous les microtubules assemblés par le taxol sont ancrés dans l'agrégat de ninéine dans le protocole 1 (I).

C: Ces agrégats ont été observés en microscopie électronique. Ils se forment autour des centrioles et ne ressemblent pas aux agrégosomes, mais ont l'air de former des structures ordonnées (E, un grossissement). En D, une cellule qui exprime peut, les agrégats semblent s'associer aux appendices sub-distaux.

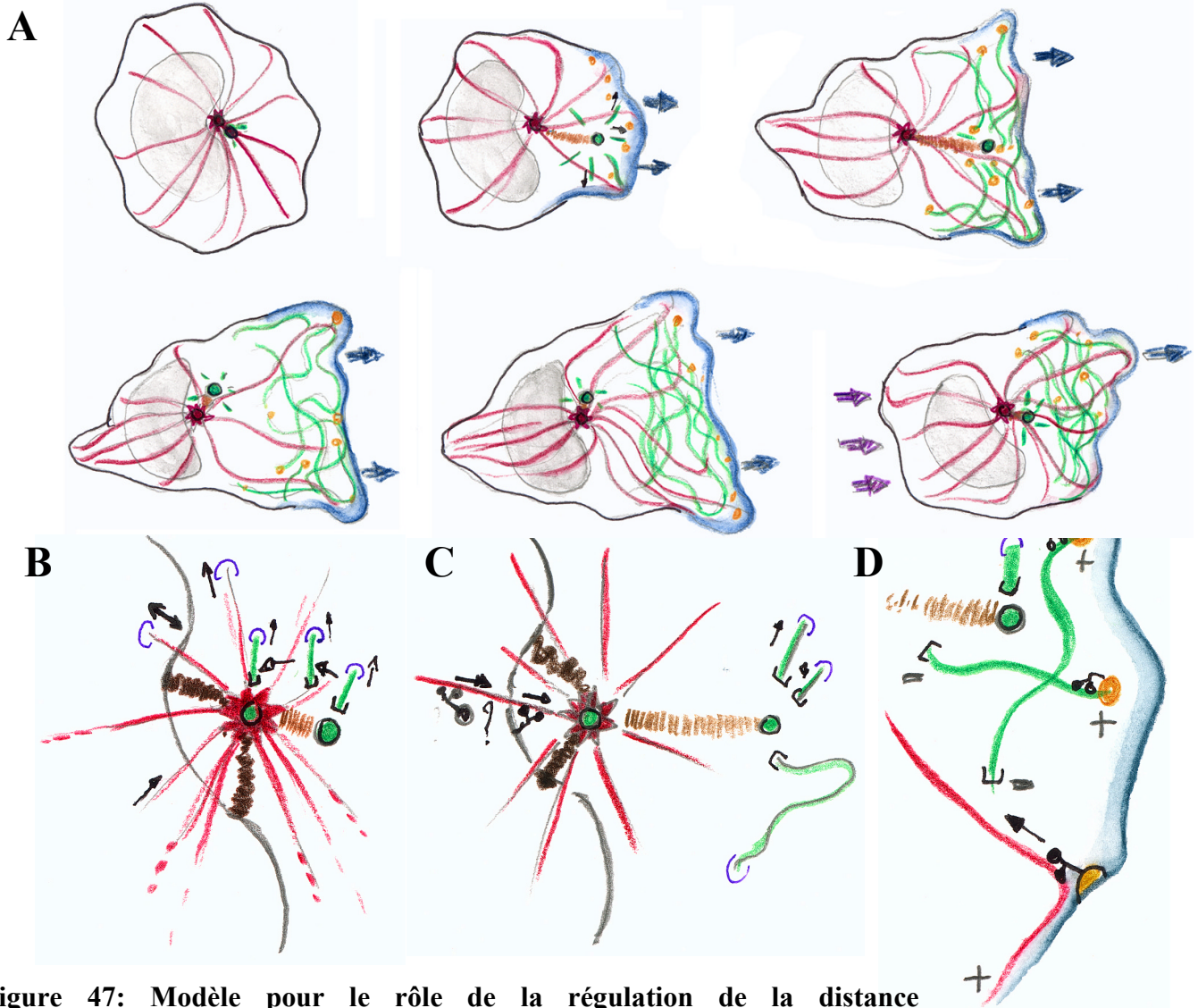
B: Les cellules qui surexpriment la ninéine ont une motilité très perturbée (A : les trajectoires noires sont celles des cellules qui surexpriment la ninéine et B: statistiques). En C on voit une cellule qui tourne sur elle-même, ce qui prouve que le problème n'est pas lié à l'activité corticale, mais plutôt à une régulation de cette activité (Abal et al., en préparation)



midbody. Elle est dirigée vers le centrosome par l'intermédiaire des microtubules, mais une fois qu'elle y est assemblée, sa localisation est indépendante du réseau de microtubules. En effet, si la protéine est surexprimée alors que les bouts moins des microtubules sont dissociés du centrosome par l'effet du taxol, la ninéine s'accumule préférentiellement aux bouts moins des microtubules. En revanche, si le taxol est ajouté une fois que la ninéine est accumulée au centrosome, elle inhibe la dissociation des microtubules habituellement observée dans les cellules non transfectées, et tous les microtubules sont ancrés au centrosome (voir la figure 45).

En filmant des cellules surexprimant la ninéine, nous avons pu mettre en évidence une inhibition quasiment totale de la motilité (voir la figure 45), ainsi qu'un retard important dans le processus d'abscission en fin de mitose, qui implique un relargage des microtubules (voir papier 2).

Des expériences sont actuellement en cours pour démontrer que la surexpression de la ninéine inhibe le relargage des microtubules du centrosome. Nous avons déjà pu montrer, à l'aide d'une co-expression de la protéine de bouts plus couplée à la GFP et de la ninéine elle aussi couplée à la GFP, que la dynamique des bouts plus au niveau de la périphérie de la cellule ne semblait pas être modifiée dans les cellules surexprimant la ninéine. Nous avons pu cependant observer une différence flagrante : dans les cellules qui surexpriment la ninéine, il est très rare, comparativement aux cellules contrôles, d'observer un agrégat d'EB1 quittant la région du centrosome pour aller vers la périphérie cellulaire (ce genre d'événement est le signe de la polymérisation d'un nouveau microtubule à partir du centrosome). Cela nous suggère que la dynamique des microtubules n'est pas perturbée, mais que très peu de nouveaux microtubules sont nucléés à partir du centrosome.



**Figure 47: Modèle pour le rôle de la régulation de la distance intercentriolaire dans la motilité cellulaire**

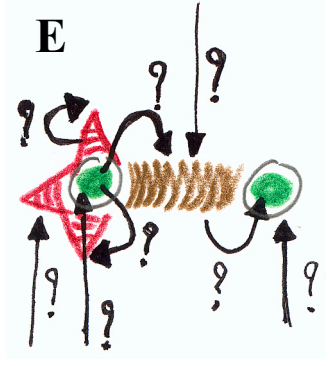
A: Une cellule qui ne migre pas est stimulée par un gradient d'attractant, le centriole fils (en vert) est déplacé vers la zone qui se polarise (en bleu) et y relâche des microtubules libres (verts). Ces microtubules stabilisent le pseudopode. Puis le centriole fils est ramené vers le centriole parental (en rouge) par une contraction du lien intercentriolaire (en ocre brun). Les microtubules qu'il relâche sont alors capturés par le centriole parental, qui est tiré vers le pseudopode stabilisé en même temps que le corps cellulaire tout entier avance.

B: Vu de plus près, le centrosome quand les deux centrioles sont proches l'un de l'autre. Les microtubules relâchés par le centriole fils (en vert) sont capturés par le centriole. On a aussi indiqué les complexes de bout plus en bleu, les complexes de bout moins en noir et, en brun foncé un potentiel lien entre le centriole parental et le noyau.

C: Quand le lien intercentriolaire est relâché, le centriole fils nucléée des microtubules qui peuvent être capturés par le cortex cellulaire. Le point d'interrogation indique la possibilité que le lien au noyau soit médié par des dynéines.

D: Les microtubules libres sont capturés à leur bout plus par les dynéines des plaques d'adhésion, tandis que les microtubules de l'aster sont capturés par d'autres dynéines corticales.

E: Les régulations du lien intercentriolaire, de l'ancrage des microtubules et de leur nucléation. Les flèches longues indiquent des signaux cytoplasmiques et les flèches courbes des rétrocontrôles activés par la tension par exemple.



Pour vérifier cela, nous envisageons d'estimer le taux de renouvellement des microtubules en réalisant des expériences de microinjection de tubuline couplée à la rhodamine dans des cellules surexprimant la ninéine.

Une étude complémentaire de l'inhibition de la ninéine ou de sa synthèse (par RNAi) est envisagée dans un deuxième temps.

### **- Plus loin : dans quels systèmes travailler ?**

#### *Systèmes expérimentaux :*

Pour mener à terme les expériences sur les rôles respectifs du centriole père et du centriole fils dans le mouvement cellulaire, il faudra impérativement développer des systèmes permettant d'observer in vivo le mouvement des centrioles dans des cellules douées de chimiotactismes ou dans un des systèmes d'induction de la polarisation cellulaire (cellules MDCK, wound healing).

Ce qu'on pourra comprendre dans de tels systèmes aura encore trait aux mécanismes modulaires du centrosome (tel mécanisme est lié au relargage des microtubules, tel mécanisme à la régulation de la nucléation, etc...), mais si on veut s'interroger sur le rôle d'intégrateur du centrosome, il faudra se placer dans des conditions plus complexes. En effet, l'importance d'un intégrateur ne se révèle souvent que dans des situations de conflits. On peut imaginer développer des systèmes dans lesquels il est possible de générer des signaux contradictoires (un signal chimiotactique et un signal mitogénique par exemple). Il serait encore plus intéressant de développer des systèmes cellulaires possédant deux tactismes à priori indépendants et de soumettre les cellules à deux gradients de directions différentes.

### Que regarder dans ces systèmes ?

Les corrélations entre motilité cellulaire et mouvement ou séparation des centrioles dans des conditions de chimiotactisme classique (un seul gradient) pourront déjà être informatives.

Il faut noter que dans les articles utilisant la technique du 'wound healing', il n'est pas fait mention d'une séparation des centrioles. Mais c'est peut-être qu'il s'agit d'échelles de temps très différentes. Les expériences présentées dans le papier 1, ainsi que celles rapportées par M. Schliwa sur l'activation des polymorphonucléaires (Schliwa et al., 1982), suggèrent que la séparation des centrioles se fait sur des échelles de temps de l'ordre de la minute, alors que les échelles de temps de la réorientation du MTOC dans les expériences de 'wound healing' sont de l'ordre de l'heure. Il pourrait donc y avoir une séparation transitoire au début du processus de polarisation. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que les mouvements du centriole fils dépendent principalement de l'actine et de la myosine, alors que les mouvements du centriole père dépendent des microtubules et de la dynéine. Or, il a récemment été démontré que le mécanisme de polarisation, qui s'accompagne de l'apparition de microtubules stabilisés et détyrosinés, et le mécanisme de repositionnement du MTOC étaient indépendants (Palazzo et al., 2001). Ainsi on pourrait penser que la voie de signalisation liée à la polarisation de la cellule agit sur le centriole fils, alors que l'autre voie déplace le centriole père dans un deuxième temps, pour que le noyau suive le corps cellulaire (voir le modèle présenté sur la figure 47). La voie de polarisation implique l'actine, la myosine et les plaques d'adhésions, alors que la voie de repositionnement du MTOC est probablement plus semblable à la voie de déplacement du noyau impliquant la régulation par la protéine LIS 1 et la dynéine (Feng et al., 2000).

Il reste aussi à étudier une potentielle régulation de l'activité de nucléation dans ces conditions : on peut imaginer qu'un signal de polarisation qui déclencherait un déplacement transitoire du centriole fils vers la zone active, pourrait aussi entraîner une augmentation de sa

capacité de nucléation des microtubules. L'utilisation de la protéine EB1 couplée à la GFP est idéale pour ce genre d'expérience, car elle permet de visualiser et de quantifier le nombre de bouts plus de microtubules qui quittent les centrioles (Mimori-Kiyosue et al., 2000). Il faudra alors pouvoir identifier la position des centrioles à l'aide d'une protéine couplée à un autre marqueur fluorescent, comme la centrine couplée à un variant rouge de la GFP (la dsRed par exemple). Il se peut très bien en revanche - cela n'a jamais été étudié - que les microtubules nucléés par le centriole fils ne soient pas marqués par EB1. En effet, il a déjà été observé que certaines protéines de bout plus ne s'associent qu'à certaines sous-populations de microtubules (Mimori-Kiyosue et al., 2000).

#### *Perturbations du centrosome : détruire (laser) ou perturber (laser, surexpressions, RNAi)*

Pour tester directement le rôle d'intégrateur du centrosome, il faut pouvoir perturber son organisation, puis placer la cellule dans les conditions de conflit décrites plus haut.

Les méthodes pour perturber le fonctionnement du centrosome sont de deux types : on peut perturber ses composants moléculaires par injection d'anticorps, surexpression de protéines ou par suppression de protéines (RNAi). Les méthodes utilisant des destructions ou des relargages locaux de drogues ou de protéines par laser seraient aussi tout à fait adaptées. La ninéine (protéine d'ancrage des microtubules), la centrine (régulée par le calcium), ou l'AKAP 450 (protéine scaffold à domaines coil-coiled) sont des cibles d'intérêt pour l'étude du mouvement cellulaire.

La deuxième méthode est une destruction complète ou partielle de l'organite par laser. Cette technique est très intéressante, car elle canule toutes les fonctions centrosomiennes à la fois et non pas un module particulier. L'enjeu sera de trouver les conditions expérimentales et les paramètres à mesurer pour mettre de mettre en évidence une différence qui ne sera peut-être que quantitative (temps de réponse). En effet, supprimer complètement un système n'est pas



toujours le meilleurs moyen de comprendre son fonctionnement, le perturber est en général plus informatif. Néanmoins, si le centrosome est vraiment lié à l'intégrité de la cellule, soumettre une cellule dépourvue de centrosome à des signaux conflictuels pourrait conduire à sa dislocation (on pourrait imaginer qu'un pseudopode parte dans la direction de chaque gradient et que la cellule se retrouve écartelée). On pourrait aussi chercher un rôle plus simple du centrosome, dans l'intégrité de l'aster dans une cellule motile par exemple : on peut en effet imaginer que, si le centriole parental est sous tension et qu'il constitue le point d'ancrage des microtubules, sa destruction entraîne la dispersion des microtubules. En revanche, dans une cellule non motile, il se peut qu'aucune tension ne s'exerce sur le centriole parental, auquel cas sa destruction ne devrait pas empêcher la formation d'un aster organisé par les dynéines (comme cela a été observé dans les cellules BSC1 par exemple, Hinchcliffe et al., 2001; Maniotis and Schliwa, 1991 ; et dans des fragments cellulaires Rodionov and Borisy, 1997; Vorobjev et al., 2001). On pourrait donc envisager de détruire le centrosome d'une cellule dont la motilité est inductible et d'observer si l'induction de la motilité s'accompagne de la désagrégation du MTOC acentriolaire.

Une expérience intéressante serait la destruction d'un seul des deux centrioles, ce qui permettrait de tester leur implication dans des réponses indépendantes.

**CENTROSOME ET CYCLE DE DIVISION  
CELLULAIRE**

## **I. INTRODUCTION :**

### **1. Généralités sur le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire fonctionne chez les eucaryotes sur quelques principes universels qui reposent, très schématiquement, sur l'activation périodique et séquentielle de kinases (les cdk) par des protéines appelées cyclines, synthétisées puis détruites elles aussi périodiquement et séquentiellement. Il y a principalement trois transitions possibles. Tout d'abord une transition entre une phase de quiescence et une phase de reproduction (l'activation du complexe cycline/cdk interphasique). A la fin de chaque division, la décision doit être prise de reprendre un cycle de division ou de ne plus se diviser, c'est aussi une transition qui a lieu lorsqu'une cellule en phase de quiescence (ou phase G0) est stimulée par des facteurs mitogéniques pour reprendre un cycle de division (c'est le point de restriction, qui est bien défini chez la levure, mais beaucoup plus mal chez les autres eucaryotes). Les cellules entrent alors dans une phase de croissance qui implique le doublement de tous leurs composants (phases G1 et S). La deuxième transition est celle qui marque la fin de la phase de croissance et le début de la phase de division (l'activation du complexe cycline/cdk mitotique, transition G2/M). Au début de la phase de division, la cellule assemble les structures qui serviront à la séparer en deux cellules filles, puis la dernière transition a lieu, qui fait passer la cellule de la phase d'assemblage des structures de division à la division proprement dite (transition métaphase/anaphase). Cette dernière phase comporte deux divisions successives : la mitose (séparation des chromosomes) et la cytotéiérèse (scission du cytoplasme).

Il y a évidemment d'autres sub-divisions de chacune de ces grandes phases.

Le concept le plus important est celui de point de contrôle (checkpoint) introduit par Hartwell et Weinert (Hartwell and Weinert, 1989, pour une revue récente voir, Walworth, 2000) : la cellule peut interrompre une des phases ou retarder l'activation de la phase suivante. Ces

contrôles sont des contrôles de qualité - l'ADN a-t-il été répliqué sans défaut ? - mais aussi de quantité - la cellule a-t-elle atteint la bonne taille (pour une revue voir Lowndes and Murguia, 2000) ? Le contrôle de qualité de l'ADN s'exerce tout au long du cycle et peut provoquer l'arrêt des cellules au cours de la phase de réplication de l'ADN, empêcher l'entrée en mitose ou bien empêcher la reprise d'un cycle de réplication de l'ADN. Il existe aussi un tel contrôle de qualité pour l'assemblage des structures mitotiques et pour la séparation des chromosomes (Murray, 1992 ; pour une revue récente voir Burke, 2000). Certaines protéines importantes pour ces contrôles peuvent très bien passer inaperçues, si rien ne vient perturber le bon déroulement du cycle de division.

Les protéines de contrôle de la réplication, quand elles ne sont pas fonctionnelles, donnent lieu à des phénotypes dits 'mutator'. C'est à dire que la cellule accumule les mutations. Lorsqu'il y a un problème dans les gènes de contrôle de la qualité de la mitose, les cellules peuvent perdre des chromosomes entiers, ou des parties de chromosome (aneuploïdie). Lorsque le contrôle de la cytodierèse est perdu, des cellules contenant plusieurs noyaux apparaissent (polyploïdie). Enfin, lorsque les cellules accumulent les erreurs, un système de mort cellulaire programmée peut être déclenché (apoptose, pour une revue récente voir Guo and Hay, 1999).

Il y a un lien évident entre tous ces mécanismes et la cancérogenèse (Hartwell, 1992). Les contrôles dont la perte a les conséquences les moins graves à court terme sont les plus fréquemment endommagés. Puis les défauts s'accumulant, les autres contrôles peuvent finir par être eux aussi altérés. Ainsi, un des premiers signes de transformation des cellules est la perte du contrôle de la cytodierèse : une cellule non transformée, si elle échoue à se diviser, ne répliquera plus son ADN. Au contraire, une cellule qui a perdu ce contrôle va redupliquer son ADN puis rentrer à nouveau dans une phase de mitose qui a toutes les chances d'être anormale puisque la cellule aura, en même temps que son noyau, dupliqué son centrosome.

On sait depuis les expériences de dispermie de Boveri (1914) qu'une mitose impliquant deux jeux de chromosomes et quatre centrosomes conduit fréquemment à une aneuploïdie (pour une revue récente voir Lingle and Salisbury, 2000 et Brinkley, 2001).

## **2. Centrosome et cycle cellulaire : un juste milieu entre 'l'organe de division' et le simple passager.**

### **- Histoire**

S'opposa presque immédiatement à la théorie de Boveri, qui voyait dans chaque centriole un 'organe de division' (mais la distinction entre centriole et centrosome n'était pas toujours claire), celle des biologistes des plantes et des protistes qui proposaient qu'il ne soit qu'un passager du pôle du fuseau, destiné à assembler un axonème. Avec la définition claire du centriole apportée par la microscopie électronique, le débat fut relancé. Afin d'y échapper, Mazia bâtit sa théorie sur l'idée du 'polar organiser' et détermina qu'il y avait deux 'polar organisers' par centrosome (Mazia et al., 1960). Après de nombreuses expériences, déjà rappelées dans l'introduction, il semble aujourd'hui clair que les 'polar organisers' des centrosomes des cellules animales sont associés aux centrioles.

Depuis l'invention de la microchirurgie par laser par Berns dans les années 70, il était réclamé que soient détruits les centrioles polaires pour connaître leur rôle (discuté dans Wheatley, The Centriole, 1982). Les expériences de Berns n'ont pas vraiment convaincu souvent pour des raisons techniques. Au cours des quatre dernières années cependant, l'expérience fut réalisée de multiples façons, parfois indirectes. La manière la plus directe fut celle employée par A. Khodjakov, à l'aide d'un laser dont la longueur d'onde n'est pas absorbée par la cellule et qui n'a un pouvoir destructeur qu'en son point de focalisation (Khodjakov et al., 1997). La réponse fut claire : dans tout les cas l'ablation, des centriole avant ou pendant la mitose, *in*

*vivo*, n'a pas compromis la formation d'un fuseau bipolaire (Khodjakov et al., 2000). Une expérience d'assemblage de fuseaux bipolaires sur des billes de chromatine en l'absence de centrosome avait été réalisée quelques années plus tôt (Heald et al., 1996). Que signifient ces résultats ? Ils signifient que les centrioles ne sont pas nécessaires à la formation d'un fuseau, ni aucune sorte de corpuscule, dans les cellules animales (chez les levures, le SPB est nécessaire). Ils ne signifient en aucune sorte que les centrosomes n'ont aucun rôle dans ce processus quand ils sont présents. En effet, un knockout (c'est ce que représente une ablation), n'a jamais révélé un mécanisme de contrôle dans des conditions expérimentales où ce mécanisme n'était pas sollicité. Toute la difficulté est justement de trouver les bonnes conditions expérimentales pour révéler ces mécanismes.

#### **- Les structures auto-assemblées**

La découverte des composants moléculaires mène automatiquement à l'identification de mécanismes d'assemblage. Dans le cas des fuseaux et des asters, la symétrie de ces structures avait pu laisser penser qu'un mécanisme complexe était nécessaire.

En fait, il s'agit d'un processus d'auto-assemblage, c'est à dire que quelques molécules, par leur propriétés physico-chimiques, lorsqu'elles sont mises ensemble, génèrent de l'ordre. Ce genre de phénomène est connu pour les cristaux liquides, mais aussi pour les systèmes de réaction/diffusion. En fait, la polymérisation est déjà un auto-assemblage. Si on ajoute en plus des protéines réticulantes, on produit un gel. La polymérisation des microtubules ou de l'actine est en plus dissipative (elle consomme de l'énergie) et les polymères produits sont polarisés, si bien que des molécules particulières sont capables, en consommant de l'énergie, de se déplacer le long de ces polymères et surtout de produire une force. On imagine assez bien comment des moteurs doubles, interagissant avec deux polymères peuvent faire se rejoindre leurs bouts et les trier pour former des aster (Nedelec et al., 1997). Si de plus ils

transportent des protéines réticulantes, celles-ci pourront assurer une plus grande cohésion entre les bouts. On peut aussi imaginer comment, au lieu d'un aster, on peut former un demi fuseau, avec cette fois deux types de moteurs qui vont chacun dans une direction différente (Surrey et al., 2001). On peut comprendre aussi pourquoi il se forme deux demi fuseaux sur des chromosomes qui ont deux kinétochores. C'est moins évident sur des billes, mais on peut par exemple penser que, si des bouts plus de microtubules se recouvrent sur une distance suffisamment grande au niveau de la bille, cela peut leur imposer d'être deux à deux anti-parallèles. Ces systèmes simplifiés permettent de bien comprendre les mécanismes morphogénétiques fondamentaux.

Les réactions que génèrent la mise en évidence de ces mécanismes sont parfois étonnantes. Ainsi, on affirme que le centrosome n'est pas nécessaire à la formation du fuseau mitotique. Puisque des fuseaux ont été assemblés sur des billes de chromatines, pourquoi n'entend-on pas que les kinétochores ne sont pas nécessaires à la formation d'un fuseau mitotique. C'est probablement que cela n'avait jamais été supposé. C'est aussi qu'on sait bien le rôle que jouent les kinétochores, grâce à une meilleure connaissance génétique et moléculaire : ils ont un rôle pour l'alignement des chromosomes et surtout pour le contrôle de qualité de l'assemblage du fuseau mitotique. Pourquoi ne pas supposer une fonction équivalente pour les centrosomes ? C'est qu'on ne sait pas estimer quantitativement la différence entre un pôle contenant un centrosome (des centrioles chez les cellules animales) et un pôle 'auto-assemblé'. Cet auto-assemblage permet-il la mise en place des mécanismes de contrôle ? C'est tout à fait possible, mais il faudrait déjà poser la question.

## **- Les rôles du centrosome**

### Fixer le nombre de pôles

De nombreuses expériences ont montré que chaque centriole semblait capable de nucléer la formation d'un pôle (voir l'introduction générale). On a aussi discuté l'importance de la notion de cohésion qui est associée au centrosome en général. En effet, un pôle sans centrosome, dans des conditions particulières de déformation de la cellule pourrait très bien ne pas avoir une cohésion suffisante et finalement se fractionner. Les mitoses acentriolaires produites par la micro-injection d'un anticorps dirigé contre une modification de la tubuline centriolaire sont parfois monopolaires (Bobinnec et al., 1998a) et souvent multipolaires (Miguel Abal, en préparation). Ainsi, asservir l'assemblage des pôles à un corpuscule dont le mécanisme de reproduction par duplication couplé au cycle cellulaire assure qu'il sera présent en mitose en exactement deux copies permet de fixer strictement le nombre de pôles.

### Déterminer la position du fuseau

L'argument le plus souvent avancé pour un rôle du centrosome, et qui a déjà été largement discuté dans l'introduction, est celui de l'importance des microtubules astraux qui lui sont associés et qui serviraient à contrôler la position du fuseau. Le pôle auto-assemblé ne semble pas capable d'adopter la configuration stratifiée du centrosome mitotique qui lui permet d'assembler deux jeux de microtubules : l'un chargé des chromosomes, l'autre de l'interaction avec le cortex. En absence de centriole, il n'y a pas de microtubules astraux (Khodjakov et al., 2000). Les fonctions de régulation connues sont attribuées à des complexes associés aux bouts plus des microtubules, au niveau des kinétochores et du cortex. Ce système est pour l'instant surtout bien décrit dans les levures (Lee et al., 2000 ; Korinek et al., 2000 ; pour une revue, Goode et al., 2000), mais des homologues de ces protéines existent chez les métazoaires (pour une revue voir Bienz, 2001). Tous les mouvements du fuseau (et du noyau en interphase) passent par l'interaction des bouts plus des microtubules et de complexes corticaux contenant



la dynéine (pour une revue voir, Bloom, 2001), ces complexes étant supposés être des mécanosenseurs (aussi bien les plaques d'adhésion, Balaban et al., 2001; Riveline et al., 2001 qu'au niveau des kinétochores, Nicklas et al., 1995; Stern and Murray, 2001). Il est tout à fait possible que les bouts moins soient ancrés passivement et que la régulation se fasse uniquement au niveau des bouts plus. Néanmoins, cette hypothèse implicitement admise est plus probablement due à la connaissance très lacunaire que l'on a actuellement de la régulation au niveau des bouts moins des microtubules.

#### Implication dans les systèmes de contrôle

Le centrosome est impliqué, par la localisation de protéines clés, dans quasiment tous les systèmes de contrôle du cycle (localisation de cdk1, de p53, des plks, de l'APC, etc...).

C'est particulièrement frappant pour le contrôle de sortie de mitose dans les deux levures : l'initiation de la cascade (le MEN pour 'mitotic exit network' chez *S.cerevisiae* et le SIN pour 'septation initiation network' chez *S.pombe*) qui contrôle la sortie de mitose est associée au SPB (pour des revue voir, Balasubramanian et al., 2000; McCollum and Gould, 2001). Dans la levure *S.cerevisiae*, il semble que la proximité du SPB et du cortex de la cellule fille déclenche la cascade de signalisation (Bardin et al., 2000; Bloecher et al., 2000; Pereira et al., 2000; Pereira and Schiebel, 2001). Ces questions seront discutées dans la partie 'Centrosome et espace cellulaire' de la discussion.

Le centrosome est aussi la cible des voies de contrôle des lésions de l'ADN (Sibon et al., 2000; Smits et al., 2000; Su and Vidwans, 2000) qui peuvent induire son désassemblage, dans l'embryon de drosophile, si la cellule entre en mitose avec un ADN endommagé. Cela semble permettre l'activation du contrôle d'assemblage du fuseau afin de bloquer la ségrégation des chromosomes (Sibon et al., 2000; Su and Vidwans, 2000). Réciproquement, des protéines centrosomiales pourraient être impliquées dans les voies de contrôle de la réparation de l'ADN (Araki et al., 2001; Smits et al., 2000).

Enfin, il a été récemment démontré, par deux techniques différentes, qu'une ablation du centrosome avait pour conséquence d'inhiber, après une première mitose, la reprise de la réplication de l'ADN (Hinchcliffe et al., 2001; Khodjakov and Rieder, 2001). Chaque technique apporte une information particulière : dans le travail de Hinchcliffe et al., les centrosomes ont été retirés par microchirurgie, en découpant un bout de la cellule, et cela a été réalisé avant la fin de la phase S. Les cellules passent la mitose, mais ne dupliquent plus leur ADN. Dans le second travail, les centrosomes ont été retirés en prophase ou en métaphase et le résultat est le même. Cela permet d'écarter un arrêt du à une entrée en mitose en l'absence de centrosome, puisque ces cellules sont rentrées en mitose avec leurs centrosomes. De plus, les auteurs ont pu réaliser une ablation d'un seul des deux pôles, qui conduit à un blocage de la cellule qui ne contient pas de centriole, alors que l'autre continue à se diviser, ce qui constitue un contrôle idéal. Cela suggère un rôle du centrosome dans la décision de reprendre un cycle de division à la suite d'une mitose. Néanmoins, le mécanisme de ce blocage est inconnu. Il est aussi assez étrange que les auteurs ne fassent pas directement mention d'expériences d'ablation sur des cellules en G1. Ils se contentent de proposer que le centrosome est important pour la transition G1/S, alors qu'il est peut-être important pour la décision de reprendre un cycle (pour la transition M/G1), ce qui est très différent et qui pourrait être déduit à partir d'une expérience d'ablation en G1 : si une ablation en G1 ne bloque pas l'entrée en S, c'est que c'est le fait de sortir de mitose sans centrosome qui active le blocage en G1. Or dans le papier de Hinchcliffe et al., les auteurs précisent que les cellules n'étaient pas en début de G1 (ils n'ont pas fait d'ablation sur des paires de cellules filles encore reliées par un pont cytoplasmique) et n'étaient pas sorties de la phase S. Cela signifie qu'il devait y avoir, statistiquement, une proportion non négligeable de cellules en G1. Donc l'ablation en G1 ne bloque pas la transition G1/S. C'est donc une sortie de mitose sans centrosome (ou bien des défauts accumulés suite à un cycle complet sans centrosome) qui est

à l'origine du blocage en G1, ce qui favorise l'hypothèse d'un rôle à la sortie de la mitose, pour entrer dans un nouveau cycle de division, ou bien l'existence d'un contrôle de la présence d'un centrosome en sortie de mitose.

## **II. RESULTATS :**

### **1. Résumé des résultats**

Ce travail présente une étude du comportement du centrosome en fin de mitose dans des lignées cellulaires exprimant stablement une protéine de fusion entre la centrine 1 humaine et la GFP. Nous décrivons l'existence d'un mouvement rapide et de grande amplitude du centriole parental à la fin de la division cellulaire et son rôle possible dans la régulation de la cytokinèse. Chaque pôle du fuseau mitotique contient une paire de centrioles. Lorsque la cellule se raccroche au substrat en fin de télophase, les deux centrioles se séparent. A ce stade, les cellules filles sont encore reliées par un pont cytoplasmique contenant des microtubules ancrés dans une structure centrale appelée pièce intermédiaire (midbody).

A la suite de leur séparation, les centrioles se comportent comme durant la phase G1 (voir le papier I) : le centriole parental reste proche du centroïde de la cellule et le centriole fils se déplace vers les zones d'activité pseudopodiale. Puis, le plus souvent dans une seule des deux cellules filles, un centriole parental, parfois accompagné du centriole fils se déplace en ligne droite vers le midbody. Le pont cytoplasmique se pince alors, ce qui correspond au relargage des microtubules de la pièce centrale, puis il se rompt peu après que le centriole ait regagné sa place au centre de la cellule.

Ce mouvement dépend des microtubules. Nous avons pu montrer qu'un traitement au nocodazole appliqué dans l'heure qui suit une synchronisation en mitose par 'mitotic shake off' inhibe le mouvement du centrosome vers le midbody. En revanche, un tel traitement semble provoquer le mouvement du centriole parental vers le midbody s'il est appliqué au moins deux heures après le 'mitotic shake off'. Quand le centrosome est dans le pont cytoplasmique en présence de nocodazole, il y reste aussi longtemps que la drogue est présente. Pendant ce temps, le pont est pincé mais ne se rompt pas. Dès que le nocodazole est retiré, le centrosome quitte le pont et celui-ci se rompt.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un couplage entre la présence du centriole parental à proximité du pont et la rupture de celui-ci. De plus, nous avons pu clairement distinguer deux étapes dans ce processus : une étape qui correspond au désassemblage du système microtubulaire du pont puis une étape de fusion de la membrane plasmique qui correspond à l'abscission proprement dite.

Nous avons ensuite cherché à trouver différents systèmes dans lesquels un défaut du centrosome pourrait provoquer un défaut de cytokinèse. Nous avons donc étudié la cytokinèse dans des cellules privées de centrosome, soit suite à une mutation génétique, soit suite à une ablation par microchirurgie. Dans les deux cas un nombre important de cellules, par rapport à des cellules contrôle, avaient un problème de cytokinèse générant des cellules binucléées ou des paires de cellules continuellement associées par un pont cytoplasmique.

Nous avons enfin cherché à comprendre quels paramètres cellulaires pouvaient affecter ce processus. Nous avons pu constater, en utilisant diverses lignées cellulaires, que l'ancrage de la cellule au substrat de culture était un facteur déterminant. Les cellules fortement ancrées (cellules 3T3 ou cellules L929 cultivées sur un substrat riche en fibronectine) avaient une cytokinèse prolongée et le mouvement du centrosome n'était pas observé. Dans la plupart des cas, les cellules finissaient par rompre leur lien par un phénomène ressemblant plus à une rupture par traction qu'au phénomène de désassemblage observé dans les cellules moins adhérentes (comme les cellules HeLa ou les cellules L929 sur un substrat pauvre en fibronectine). De plus, les cellules HeLa poussant en clone présentait une abscission très régulièrement située entre 1h30 et 2h30 après l'anaphase, alors que des cellules isolées pouvaient se séparer jusqu'à 5h après l'anaphase.

Nous en déduisons un modèle selon lequel le centrosome serait capable d'intégrer des signaux ayant trait à l'adhésion. Quand la cellule est bien réétablie ou qu'elle a établi un contact avec

ses voisines, le centriole parental est déplacé vers le pont, ce qui constitue le signal d'abscission.



## **2. Papier II : Centrosome dependant exit of cytokinesis in animal cells**

La fin de la cytokinèse est sous le contrôle du centrosome dans les cellules animales





3. M. A. McNiven, M. Wang, K. R. Porter, *Cell* **37**, 753 (1984); V. I. Rodionov, G. G. Borisov, *Nature* **386**, 170 (1997).

4. A. Maniotis, M. Schliwa, *Cell* **67**, 495 (1991).

5. A. Khodjakov, R. W. Cole, B. R. Oakley, C. L. Rieder, *Curr. Biol.* **10**, 59 (2000).

6. G. Sluder, F. J. Miller, R. Cole, C. L. Rieder, *J. Cell Biol.* **110**, 2025 (1990); D. L. Gard, S. Hafezi, T. Zhang, S. J. Doxsey, *J. Cell Biol.* **110**, 2033 (1990).

7. E. H. Hinchcliffe, G. O. Cassels, C. L. Rieder, G. Sluder, *J. Cell Biol.* **140**, 1417 (1998); A. Khodjakov, C. L. Rieder, *J. Cell Biol.* **146**, 585 (1999); E. H. Hinchcliffe, C. Li, E. A. Thompson, J. L. Maller, G. Sluder, *Science* **283**, 851 (1999).

8. E. Bailly, M. Doree, P. Nurse, M. Bornens, *EMBO J.* **8**, 3985 (1989); S. M. Pockwinse et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 3022 (1997).

9. E. Bailly, M. Bornens, *Nature* **355**, 300 (1992).

10. BSC-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing fetal bovine serum (10%) and 12 mM Hepes (pH 7.2 in 5% CO<sub>2</sub>). Cover slips bearing cells were assembled into a micromanipulation chamber filled with DMEM and FC-47 [G. Sluder, F. J. Miller, E. H. Hinchcliffe, *Methods Cell Biol.* **61**, 439 (1999)]. Microsurgery was done at 37°C with a piezoelectric micromanipulator on a Zeiss ACM microscope equipped with phase contrast optics. Karyoplast position on the cover slip was marked with a diamond scribe mounted in the nose-piece of the microscope before the preparation was moved to the prewarmed videomicroscope system.

11. Karyoplasts were observed with Zeiss Universal or WL microscopes equipped with phase contrast optics and shuttered illumination pathways. Microscopes were maintained at 37°C in a cardboard box with a proportional temperature control system (Omega Engineering, Stamford, CT). Images were taken with a charge-coupled device (CCD) camera (Orca; Hamamatsu, East Bridgewater, NJ), and video sequences were written to the hard drive of a PC using C-imaging software (Compix Inc., Brandywine, PA).

12. For supplementary figures, see *Science* Online ([www.sciencemag.org/cgi/content/full/291/5508/1547/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/291/5508/1547/DC1)).

13. Within 1 hour after mitosis for the karyoplast of interest, the medium was replaced with DMEM containing BrdU (10 µg/ml) and the preparation was returned to the microscope. When 12 or 28 hours had elapsed since mitosis, the karyoplasts were fixed in methanol for 5 min at -20°C, then immediately transferred to 4 M HCl at room temperature for 2 hours and processed for immunofluorescence microscopy [N. Gunduz, *Cytometry* **6**, 597 (1985)] using a mouse BrdU monoclonal antibody (mAb) (Boehringer Mannheim).

14. E. H. Hinchcliffe, F. J. Miller, M. Cham, A. Khodjakov, G. Sluder, data not shown.

15. Karyoplasts were labeled in vivo with Bodipy FL C<sub>5</sub>-ceramide (Molecular Probes, Eugene, OR) as described [R. E. Pagano, C.-S. Chen, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **845**, 152 (1998)].

16. W. Steffen, H. Fuge, R. Dietz, M. Bastmeyer, G. Muller, *J. Cell Biol.* **102**, 1679 (1986); R. Heald et al., *Nature* **382**, 420 (1996).

17. M. Piel, J. Nordberg, U. Euteneuer, M. Bornens, *Science* **291**, 1550 (2001).

18. Karyoplasts were fixed in -20°C methanol and processed for immunofluorescence microscopy. We used α-tubulin mAb (Sigma) and polyclonal antibodies to γ-tubulin (Sigma) or to pericentrin. Observations were made with Zeiss Axiophot or Leica DMR microscopes equipped for epifluorescence. Images were recorded with an Orca CCD camera and stored using C-imaging software. Each karyoplast was relocated using the scribed circle on the cover slip.

19. J. S. Lanni, T. Jacks, *Mol. Cell Biol.* **18**, 1055 (1998).

20. Taxol (Sigma) was used in DMEM at 200 to 500 nM.

21. C. L. Rieder, A. Schultz, R. Cole, G. Sluder, *J. Cell Biol.* **127**, 1301 (1994).

22. Postmitotic karyoplasts were located, fixed in 2.5% glutaraldehyde, and processed for serial section ultrastructural analysis [C. L. Rieder, G. Cassels, *Methods Cell Biol.* **61**, 297 (1999)].

23. G. Sluder, E. H. Hinchcliffe, *Biol. Cell* **91**, 413 (1999).

24. A. W. Murray, M. W. Kirschner, *Nature* **339**, 275 (1989); G. Schatten, C. Simerly, H. Schatten, *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4152 (1985); K. C. Vaughn, J. D. Harper, *Int. Rev. Cytol.* **181**, 75 (1998).

25. We thank A. Murray and C. Rieder for helpful discussions, S. Doxsey for antibody to pericentrin, and S. Lambert, W. Theurkauf, and D. McCollum for critically reading the manuscript. Supported by grants from

NIH (G.S. and A.K.) and the Trustees of the Worcester Foundation (G.S.) and by a postdoctoral fellowship from the American Cancer Society, Massachusetts Division (E.H.H.).

24 October 2000; accepted 16 January 2001

## Centrosome-Dependent Exit of Cytokinesis in Animal Cells

Matthieu Piel,<sup>1</sup> Joshua Nordberg,<sup>2</sup> Ursula Euteneuer,<sup>3</sup> Michel Bornens<sup>1\*</sup>

As an organelle coupling nuclear and cytoplasmic divisions, the centrosome is essential to mitotic fidelity, and its inheritance could be critical to understanding cell transformation. Investigating the behavior of the centrosome in living mitotic cells, we documented a transient and remarkable postanaphase repositioning of this organelle, which apparently controls the release of central microtubules from the midbody and the completion of cell division. We also observed that the absence of the centrosome leads to defects in cytokinesis. Together with recent results in yeasts, our data point to a conserved centrosome-dependent pathway that integrates spatial controls into the decision of completing cell division, which requires the repositioning of the centrosome organelle.

The checkpoint concept (1, 2) was introduced to describe mechanisms controlling the progression of the cell division cycle at critical steps that impose delays to allow corrections or repairs, or even to trigger cell death. Many of the key genes involved in these processes are not essential but, when defective, can be oncogenic (3). In *Saccharomyces cerevisiae*, a checkpoint mechanism monitors the coupling between nuclear and cytoplasmic division and relies on the spatial proximity of interacting components. A guanosine triphosphatase (GTPase) is concentrated at the spindle pole body (SPB), whereas the corresponding exchange factor is concentrated in the bud. Therefore, the migration of one SPB to the neck is necessary to activate the GTPase and to trigger mitotic exit (4–7). This ensures that cytokinesis does not take place before the nucleus has entered the bud.

We investigated whether similar spatial controls involving the centrosome (the functional equivalent of the SPB) might operate in vertebrate cells, which are much larger than yeast cells. We made time-lapse recordings of cell division in cell lines stably expressing the centrin protein coupled to the green fluorescent protein (GFP) as a centrosomal marker (8). During mitosis, cells possess two centrosomes located at the spindle poles, one of

which is inherited by each of the two daughter cells. Each centrosome is made up of a daughter centriole that was assembled during the previous S phase and a mother centriole that was assembled during a previous cycle. The two centrioles can be distinguished ultrastructurally (9) and biochemically (10). In vivo, the mother centriole is also more strongly labeled by centrin-GFP than is the daughter centriole during the first hours of the G<sub>1</sub> phase (10).

After furrow ingression is completed, there is a period (from 1.5 to 5 hours) during which daughter cells are still linked by a cytoplasmic bridge before cytokinesis is complete (abscission). We observed that the first centrosomal event after formation of the cleavage furrow was the separation of the two centrioles in each daughter cell (Fig. 1, A and B, panel b), the daughter centriole being more motile than the mother centriole, which bears the microtubule (MT) aster and sits near the cell center (10). Just before abscission, the mother centriole in one (70% of the cases) (Fig. 1) or in both daughter cells [Web movie 3, part 1 (11)] transiently left its central position and moved straight to the intercellular bridge [Fig. 1, A and B, panels c and d; Fig. 1C; and Web fig. 1 (11)]. This movement was as fast as 10 µm/min (2 µm/min on average). When the mother centriole moved back to the cell center, cytokinesis was completed. This unexpected movement was observed in 45 of 50 HeLa cells. In most cases (75%), the mother centriole stayed near the bridge for <1 hour (15 min on average). Altogether, the asynchrony of abscission and the correlative movement of the mother centriole to the

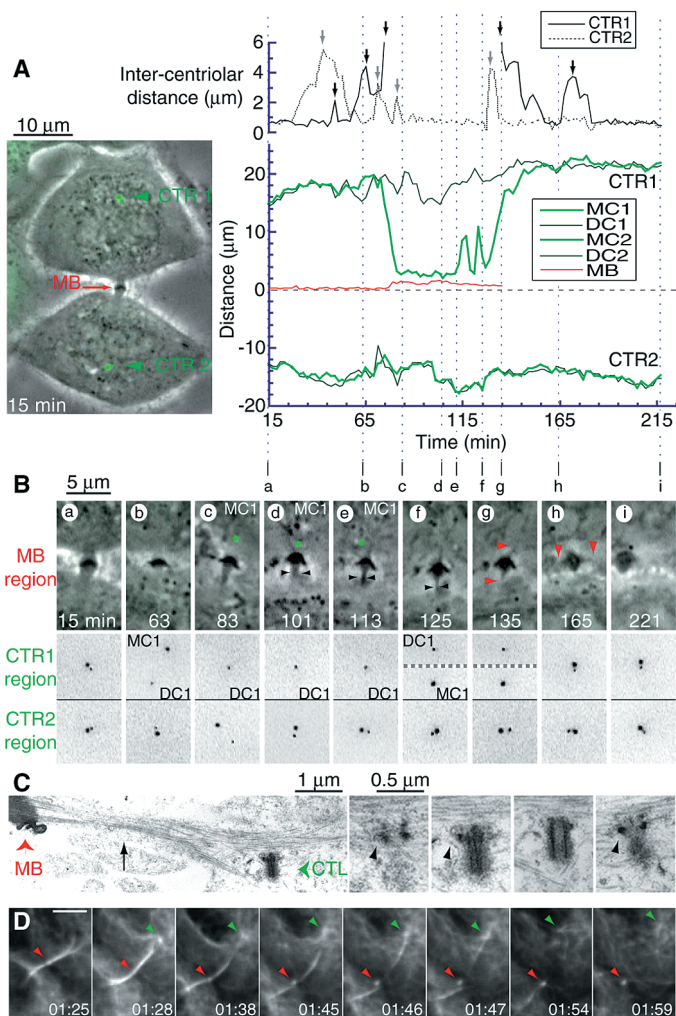
<sup>1</sup>Institut Curie, Section Recherche, UMR 144 du CNRS, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. <sup>2</sup>Department of Cell Biology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA. <sup>3</sup>Zellbiologie, Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, D-80336 München, Germany.

\*To whom correspondence should be addressed.

REPORTS

**Fig. 1.** HeLa cell stably expressing centrin-GFP.

(A) Cells were video-recorded in phase contrast and fluorescence microscopy (12). Fifteen minutes after anaphase onset, furrow ingression is completed (left). Each daughter cell has inherited a centrosome (CTR1 and CTR2, green arrows) containing a mother centriole (MC1 or MC2) and a daughter centriole (DC1 or DC2). The movements of the centrioles and of the mid-body (MB, red arrow) were recorded at 30 frames/hour. Their distance to the middle of the bridge is plotted on the right (colored curves). The two black upper curves show the intercentriolar distance for each centrosome. The "a" to "i" labeling on the time axis corresponds to events illustrated in (B) as phase contrast of the mid-body and GFP signal at the poles (black and white). Centrioles, which are still orthogonal at each pole in point a have split in both centrosomes in point b. MC1 approaches the intercellular bridge (green dot) in c. The midbody has moved toward the approaching centriole, and they are <2 μm away from one another in point d. The bridge narrows from ~1.2 μm wide in d to 0.3 μm wide in f, when MC1 moves back to the pole (the dotted line indicates that the intercentriolar distance is larger than shown), and finally detaches on both sides (red arrowheads) in g, when MC1 is back at the pole. As shown in h and i, the two daughter cells are separated, and the midbody is free in the medium (it has rotated) [see Web movie 1 (17)]. (C) The left panel shows an electron microscope picture (left) of the midbody and the microtubule bundle, with a pinched region (arrow), emanating from it. CTL, mother centriole. The right panels show serial sectioning through the mother centriole; black arrowheads indicate subdistal appendages, interacting with the microtubule bundle [see Web fig. 1 (17)]. (D) Time-lapse recording (hour:minutes) of U2OS cells expressing both β-tubulin-GFP and centrin-RFP (red fluorescent protein) [see Web movie 2 (17)]. Red arrowhead indicates the midbody; green arrowhead indicates the mother centriole. Bar, 5 μm.

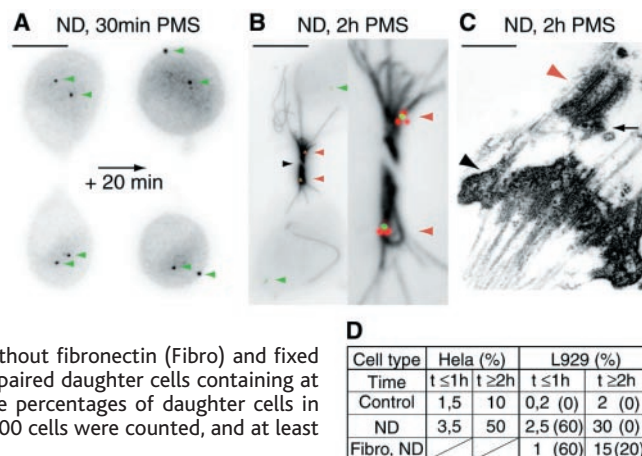


(A) Cells were video-recorded in phase contrast and fluorescence microscopy (12). Fifteen minutes after anaphase onset, furrow ingression is completed (left). Each daughter cell has inherited a centrosome (CTR1 and CTR2, green arrows) containing a mother centriole (MC1 or MC2) and a daughter centriole (DC1 or DC2). The movements of the centrioles and of the mid-body (MB, red arrow) were recorded at 30 frames/hour. Their distance to the middle of the bridge is plotted on the right (colored curves). The two black upper curves show the intercentriolar distance for each centrosome. The "a" to "i" labeling on the time axis corresponds to events illustrated in (B) as phase contrast of the mid-body and GFP signal at the poles (black and white). Centrioles, which are still orthogonal at each pole in point a have split in both centrosomes in point b. MC1 approaches the intercellular bridge (green dot) in c. The midbody has moved toward the approaching centriole, and they are <2 μm away from one another in point d. The bridge narrows from ~1.2 μm wide in d to 0.3 μm wide in f, when MC1 moves back to the pole (the dotted line indicates that the intercentriolar distance is larger than shown), and finally detaches on both sides (red arrowheads) in g, when MC1 is back at the pole. As shown in h and i, the two daughter cells are separated, and the midbody is free in the medium (it has rotated) [see Web movie 1 (17)]. (C) The left panel shows an electron microscope picture (left) of the midbody and the microtubule bundle, with a pinched region (arrow), emanating from it. CTL, mother centriole. The right panels show serial sectioning through the mother centriole; black arrowheads indicate subdistal appendages, interacting with the microtubule bundle [see Web fig. 1 (17)]. (D) Time-lapse recording (hour:minutes) of U2OS cells expressing both β-tubulin-GFP and centrin-RFP (red fluorescent protein) [see Web movie 2 (17)]. Red arrowhead indicates the midbody; green arrowhead indicates the mother centriole. Bar, 5 μm.

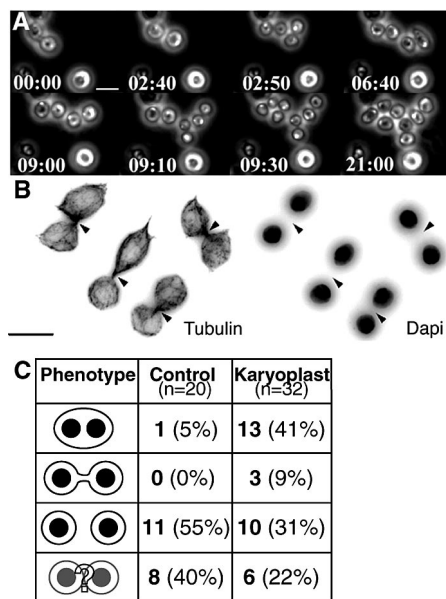
bridge region suggested the existence of a control that depended on the repositioning of the centrosome.

Recording both phase contrast and epifluorescence images (12) revealed that narrowing of the bridge on both sides of the mid-body, which always preceded abscission (13–15), took place within a few minutes after mother centriole repositioning to the bridge (Fig. 1, A and B, panels d through f), when the MT bundles were released from the mid-body (Fig. 1D). We noted, however, that the final cut of the bridge always occurred after the mother centriole moved from the bridge back to the cell center, indicating that narrowing of the bridge and abscission were distinct events. For example, the mother centriole could stay near the bridge for >1 hour after narrowing of the bridge (25% of the cases; 90 min on average), and abscission occurred only when the mother centriole had moved away. Although the bridge could be cut on both sides of the midbody, abscission occurred preferentially on the side where the mother centriole came close to the bridge. In addition, we investigated whether the daughter centrioles could also be involved in that process because, in a fixed population of L929 cells, we often observed daughter centrioles close to the intercellular bridge. However, a time-lapse recording revealed that abscission occurred only after a mother centriole had also moved toward the bridge. Therefore, it is the mother centriole behavior that matters. We then demonstrated that, contrasting with the actomyosin-dependent movements of the daughter centriole (10), the transient repositioning of the mother centriole depended on a remodeling of the post-anaphase MT network; when we perturbed the MT cytoskeleton by short treatment (15 min) with the MT-disrupting agent nocodazole (ND) applied <1 hour after mitotic shake (mitotic cells collected by a shake-off), a rapid repositioning of mother centrioles at the cell periphery opposite to the midbody was observed (Fig. 2, A and D). By contrast, when

**Fig. 2.** Repositioning of the mother centriole depends on post-anaphase microtubule network remodeling. Throughout these images of post-mitotic shake (PMS) L929 cells, centrioles are indicated by green or red arrowheads when identified as mother centrioles. The midbody is indicated by a black arrowhead. (A) Thirty minutes after mitotic shake, L929 cells stably expressing centrin-GFP (black and white) were treated with 5 μM ND and time-lapse recorded. After 20 min, one centriole in each daughter cell had relocated toward the cell periphery. Bar, 10 μm. (B) ND was added 2 hours after mitotic shake, and cells were fixed 15 min later and stained for α-tubulin (black and white) and ninein (red). The GFP signal is shown in green. The two mother centrioles, identified by the antibody to ninein (10), are relocated inside the bridge (fourfold magnification is shown on the left). Bar, 10 μm. (C) Electron microscope observation of the midbody region of HeLa cells treated as in (B). The arrow indicates an appendage typical of a mother centriole. Bar, 0.5 μm. (D) After mitotic shake, cells were seeded on coverslips with (20 μg/ml) or without fibronectin (Fibro) and fixed at various times after ND treatment (29). The numbers are the percentages of paired daughter cells containing at least one centriole in the intercellular bridge region. Between brackets are the percentages of daughter cells in which the mother centriole was found near the cell periphery. For each case, 1000 cells were counted, and at least three independent experiments were performed.



REPORTS

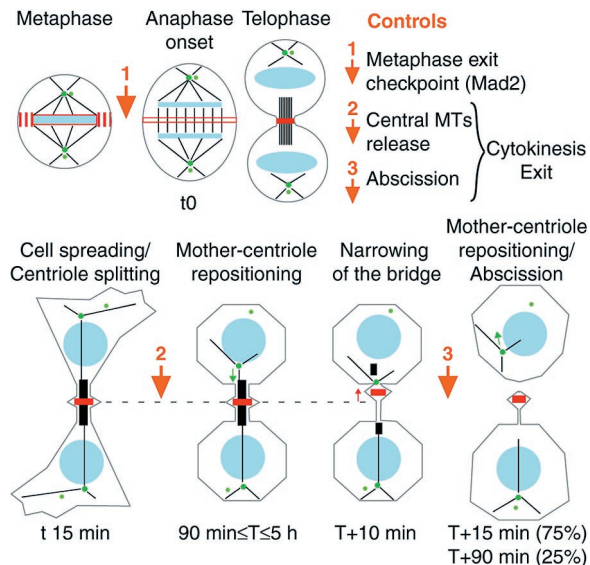


**Fig. 3.** Cytokinesis defect of acentrosomal cells. (A) Cells from the *Drosophila melanogaster* 1182-4 cell line were video-recorded in phase contrast microscopy over 2 days (hour:minutes). Cells stay in pairs during the entire cell cycle. They separate during the following mitosis. Bar, 10  $\mu$ m. (B) Unsynchronized 1182-4 cells, which were fixed and stained for microtubules and DNA, display a MT bridge (arrowhead) and no aster. DNA staining shows that abscission was not inhibited by the presence of a DNA bridge (15). Bar, 10  $\mu$ m. (C) Control BSC1 cells and karyoplasts obtained by microsurgical removal of centrosomes were video-recorded (18). Various postmitotic phenotypes were observed: furrow regression leading to binucleated cells (first row), no furrow regression and no abscission leading to two cells linked by a cytoplasmic bridge (second row), full separation leading to two independent daughter cells (third row), and cells too close to one another to enable a clear observation of abscission (fourth row).

ND was applied 2 hours after mitotic shake, mother centrioles were found inside the intercellular bridge, close to the midbody (Fig. 2, B through D). We took advantage of this effect to confirm the role of the centrosome in the control of abscission, as short ND treatment enabled us to control the moment at which the mother centriole moved toward and away from the bridge; when mother centrioles repositioned deep inside the bridge after ND treatment, the intercellular bridge did not cut as long as ND was present (up to 2 hours), and the mother-centriole was maintained in the bridge. A few minutes after ND removal, the centriole moved away from the bridge, and abscission immediately followed (7 out of 10 cells).

We conclude that an important requirement for abscission to occur is to bring together a mother centriole and the midbody. This could reflect the need for spatial proximity, reminiscent of the yeast SPB-dependent pathway for cytokinesis.

**Fig. 4.** Model. The metaphase exit checkpoint controls chromosome segregation and cyclin-dependent kinase 1 inactivation, which is necessary for assembly of the centrally located MTs, the telophase disk in the midzone, and the cleavage furrow (30). Once furrow ingression is complete, daughter cells demonstrate opposite ruffling activities. During this period, the centrosome in each daughter cell is retained on the leading-edge side. Each mother centriole is under tension exerted by the interaction of its associated MTs with the cell periphery and with the midbody [see Web Fig. 2 (11)]. A progressive change in the MT network occurs (Fig. 2), the duration of which depends on contact with neighboring cells or on substrate adhesion. This period reflects the need for daughter cells to integrate information from their periphery before proceeding. When conditions are met, ruffling activity would be actively suppressed in one or both cells, and one or both mother centrioles would reposition to the bridge, possibly through the activity of kinesin Eg5 (31). The repositioning of a mother centriole would be instrumental in triggering the release of the central spindle MTs, because its proximity with the midbody activates a signaling pathway. Finally, the disassembly of the actin ring and the sealing of the plasma membrane occur only when the mother centriole has moved back within the cell body, indicating that the mother centriole is also participating in this phase. *T*, time of centrosome repositioning.



To test more directly whether the centrosome plays a role in the completion of cytokinesis, we carried out centrosome-removal experiments. Although centrosome-deprived cells (karyoplasts) have been reported to be unable to enter mitosis (16), this result is at variance with another method of centrosome disruption in HeLa cells (17). Microsurgical ablation of centrosomes in BSC1 cells was reinvestigated, coupled with video-microscopy observations (18). Most of the centrosome-free cells went through an apparently normal mitosis (18), but a highly significant number of them had cytokinesis defects (Fig. 3C). We also reinvestigated the division process of the acentriolar *Drosophila* cell line 1182-4 (19, 20). This cell line was reported to become rapidly polyploid and has to be subcloned regularly. We observed that 1182-4 cells have an incomplete cytokinesis (Fig. 3, A and B), leading to daughter cells permanently linked by a MT-containing bridge from where the MT network seemed to be organized (73% of cells showed MT-containing bridges, 14% were individual mononucleated cells, and 13% were multinucleated). No MT aster was visible in these cells, consistent with the absence of a centrosome. Paired cells often separated at the next mitosis, although four connected cells or larger aggregates could be observed. Time-lapse recording revealed that the cell division cycle was also severely affected: its duration varied from 6 to 24 hours, not only from one cell to another but also from one cycle division cycle to the next. Paired cells could eventually fuse to

form binucleated cells that usually did not divide anymore. Altogether, these results suggest that the centrosome organelle has a direct role in the process of abscission.

We attempted to identify conditions modifying the timing of abscission by varying culture conditions for three cell lines [Web movie 3 (11)]. In HeLa cells grown in small clones (like in Fig. 1), abscission occurred ~2 hours after the onset of anaphase, in a 1-hour window, and coincided with the contact of spreading daughter cells with their neighbors. However, when cells were seeded at low density, abscission was more asynchronous and sometimes occurred as late as 5 hours after the onset of anaphase. L929 cells, when seeded on a low concentration of fibronectin (1  $\mu$ g/ml solution; 10 cells), were poorly adherent, and their abscission process was similar to that of HeLa cells at low density. When seeded on a high concentration of fibronectin (20  $\mu$ g/ml solution; 10 cells), these cells flattened extensively, and split centrioles seemed to be attracted toward lamellipodia [this could be demonstrated by brief ND treatment (Fig. 2D)]. Under these conditions, abscission was delayed (taking twice as long on average) or even failed to take place. Intercellular bridges could be very long and eventually torn under the traction exerted by the two daughter cells, without repositioning of a centriole in the bridge (4 out of 10 cells). Finally, in strongly adherent flat 3T3 cells seeded on fibronectin (5  $\mu$ g/ml), centriole movement toward the midbody was completely inhibited (5 out of 5 cells).

Abscission occurred in a markedly different manner: A very extensive stretching of the intercellular bridge between the daughter cells could be observed. In these cells, the midbody itself apparently never disassembled [Web movie 3, part 3 (11)]. We conclude that a key parameter for the movement of the mother centriole, and for abscission, is cellular adhesion to the substrate or contact to neighboring cells.

Strongly adherent cultured cells can apparently divide by traction-mediated "cytofission" (21). Some mammalian cells can divide without actomyosin rings when attached to a solid substrate (22), a behavior reminiscent of *Dictyostelium discoideum* cytokinesis mutants (23). Traction-mediated cytofission is unlikely to occur in a tissue where cells are not free to move far away from one another and thus could be an artifact due to cell culture on too-adhesive substrates rather than a genuine alternative pathway. We noted, for example, that 3T3 or L929 cells grown on a very adherent substrate show many binucleated cells, suggesting frequent cytokinesis defects. Moreover, several recent reports have shown that cytokinesis can reverse after furrowing, leading to the formation of binucleated cells, or it can be blocked at a late stage, the two cells being linked by a cytoplasmic bridge (24, 25). In agreement with other reports (26–28), our data strongly support the idea that abscission is a regulated process.

Our observations on living cells can be interpreted by the model shown in Fig. 4. At the exit of metaphase, cells assemble three structures: the so-called central spindle, the cleavage furrow, and the telophase disk/midbody. We propose that the disassembly of the central spindle and the cleavage furrow, both necessary for abscission, are distinct events that, like metaphase spindle disassembly, are under tight control; we also propose that these controls would involve the repositioning of the centrosome with respect to the midbody.

This control implies that the centrosome, which normally maintains itself at the cell center, moves transiently to the cell periphery. In addition to its relevance for cell division control, such a behavior could reveal a more general function of the centrosome, namely to integrate spatial constraints, for example, during cell locomotion and cell differentiation.

References and Notes

1. L. H. Hartwell, T. A. Weinert, *Science* **246**, 629 (1989).
2. A. W. Murray, *Nature* **359**, 599 (1992).
3. L. Hartwell, *Cell* **71**, 543 (1992).
4. M. A. Hoyt, *Cell* **102**, 267 (2000).
5. A. J. Bardin, R. Visintin, A. Amon, *Cell* **102**, 21 (2000).
6. A. Bloecher, G. M. Venturi, K. Tatchell, *Nature Cell Biol.* **2**, 556 (2000).
7. G. Pereira et al., *Mol. Cell* **6**, 1 (2000).
8. Cell culture and coverslip coatings were performed as described (10).

9. M. Paintrand, M. Moudjou, H. Delacroix, M. Bornens, *J. Struct. Biol.* **108**, 107 (1992).
10. M. Piel et al., *J. Cell Biol.* **149**, 317 (2000).
11. Web material is available at [www.sciencemag.org/cgi/content/full/291/5508/1550/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/291/5508/1550/DC1).
12. Time-lapse recordings were performed as described (10). To record post-anaphase movements of the centriole, we acquired a z-series every 2 min with a  $\times 100$  objective in both phase contrast and epifluorescence, enabling us to follow centriole movements and intercellular bridge morphology at a high resolution without losing the focus, which was crucial for determining the rupture of the bridge. The illumination device was a 100-W halogen lamp, with the potentiometer set under 8 V to avoid overillumination. In these conditions, cells could enter mitosis and exit metaphase without any delay, as compared to cells recorded in phase contrast only.
13. B. Byers, D. H. Abramson, *Protoplasma* **66**, 413 (1968).
14. J. M. Mullins, J. J. Bieseke, *Tissue Cell* **5**, 47 (1973).
15. ———, *J. Cell Biol.* **73**, 672 (1977).
16. A. Maniotis, M. Schliwa, *Cell* **67**, 495 (1991).
17. Y. Bobinnec et al., *J. Cell Biol.* **143**, 1575 (1998).
18. E. H. Hinchcliffe, F. J. Miller, M. Cham, A. Khodjakov, G. Sluder, *Science* **291**, 1547 (2001).
19. A. Debec, *Nature* **274**, 255 (1978).
20. ———, C. Abbadie, *Biol. Cell* **67**, 307 (1989).
21. K. Burton, D. L. Taylor, *Nature* **385**, 450 (1997).
22. C. B. O'Connell, S. P. Wheatley, S. Ahmed, Y. L. Wang, *J. Cell Biol.* **144**, 305 (1999).
23. J. H. Zang et al., *Mol. Biol. Cell* **8**, 2617 (1997).
24. Y. Yasui et al., *J. Cell Biol.* **143**, 1249 (1998).
25. K. Emoto, M. Urmeda, *J. Cell Biol.* **149**, 1215 (2000).
26. A. F. Straight, C. M. Field, *Curr. Biol.* **10**, 760 (2000).
27. J. C. Canman, D. B. Hoffman, E. D. Salmon, *Curr. Biol.* **10**, 611 (2000).
28. S. P. Wheatley, Y. Wang, *J. Cell Biol.* **135**, 981 (1996).
29. Mitotic cells were shaken off and seeded on coverslips. The coverslips were either uncoated (for HeLa cells) or coated with low (1  $\mu\text{g/ml}$  solution) or high (20  $\mu\text{g/ml}$  solution) fibronectin concentration (10). Every 30 min, cells were treated with 5  $\mu\text{M}$  ND for 15 min, fixed, and processed for immunofluorescence as described (10).
30. S. P. Wheatley et al., *J. Cell Biol.* **138**, 385 (1997).
31. C. M. Whitehead, J. B. Rattner, *J. Cell Sci.* **111**, 2551 (1998).
32. We thank A. Debec for the kind gift of the 1182-4 cell line; N. Delgehr for the tubulin-GFP-expressing U2OS cell line; and A.-M. Tassin, A. Paoletti, A. Taddei, O. Smrzka, and G. Almouzni for critical reading of the manuscript. This work was supported by CNRS and Institut Curie and by an NIH grant (to G. Sluder, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA).

9 November 2000; accepted 16 January 2001

## Structure of a Bag/Hsc70 Complex: Convergent Functional Evolution of Hsp70 Nucleotide Exchange Factors

Holger Sondermann,<sup>1</sup> Clemens Scheufler,<sup>1</sup> Christine Schneider,<sup>1</sup> Jörg Höfeld,<sup>2</sup> F.-Ulrich Hartl,<sup>1</sup> Ismail Moarefi<sup>1\*</sup>

Bag (Bcl2-associated athanogene) domains occur in a class of cofactors of the eukaryotic chaperone 70-kilodalton heat shock protein (Hsp70) family. Binding of the Bag domain to the Hsp70 adenosine triphosphatase (ATPase) domain promotes adenosine 5'-triphosphate-dependent release of substrate from Hsp70 in vitro. In a 1.9 angstrom crystal structure of a complex with the ATPase of the 70-kilodalton heat shock cognate protein (Hsc70), the Bag domain forms a three-helix bundle, inducing a conformational switch in the ATPase that is incompatible with nucleotide binding. The same switch is observed in the bacterial Hsp70 homolog DnaK upon binding of the structurally unrelated nucleotide exchange factor GrpE. Thus, functional convergence has allowed proteins with different architectures to trigger a conserved conformational shift in Hsp70 that leads to nucleotide exchange.

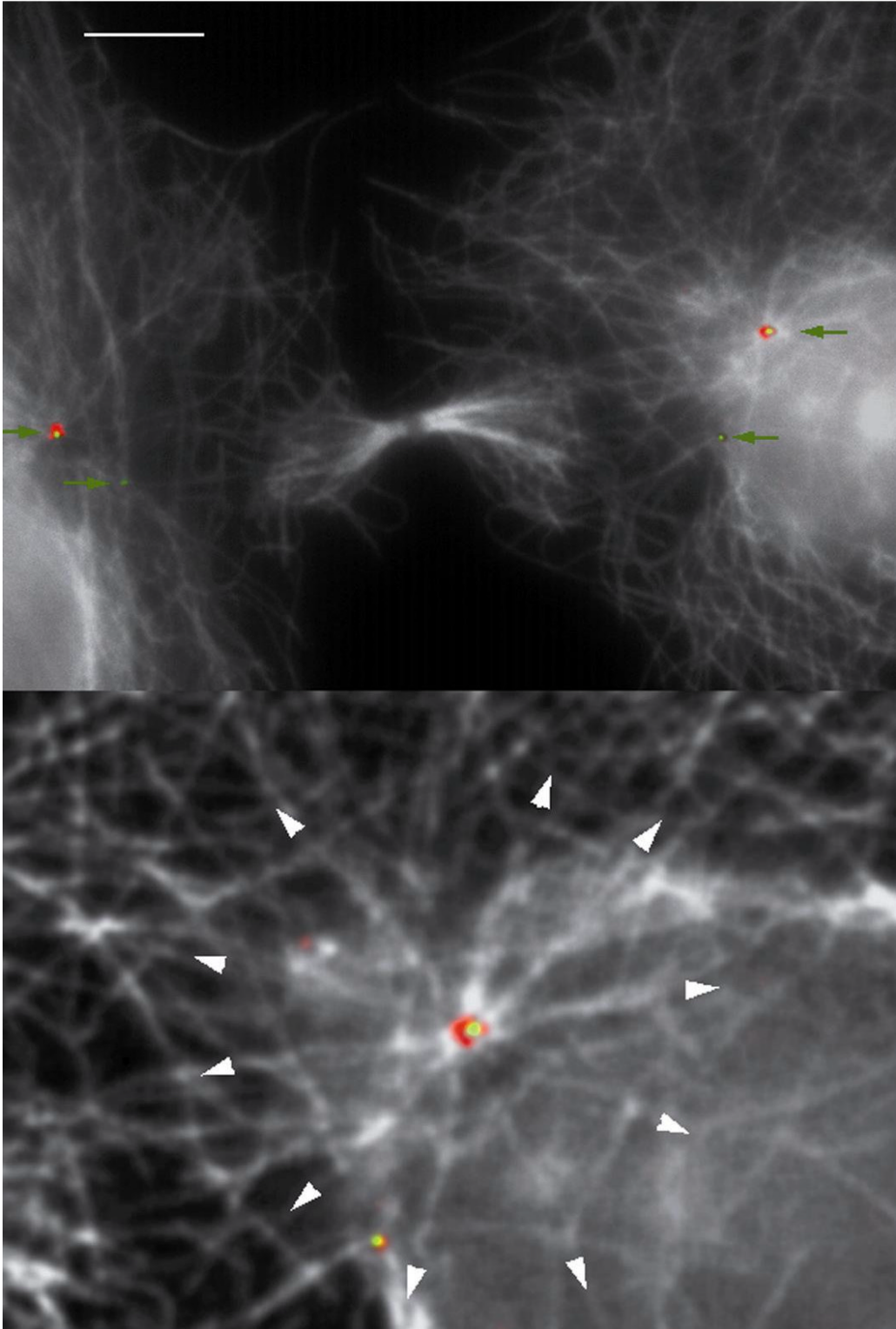
The evolutionary conserved members of the Hsp70 family play essential roles in preventing misfolding and aggregation of newly synthesized or unfolded proteins (1–3). Coordinated binding and release of substrates by these molecular chaperones is strictly dependent on their ATPase activity. Nucleotide

binding to the NH<sub>2</sub>-terminal ATPase domain of Hsp70 regulates the substrate binding properties of its COOH-terminal peptide-binding domain by an unknown mechanism (4, 5). Hsp70 binds adenosine 5'-triphosphate (ATP) with high affinity and slowly hydrolyzes it to adenosine 5'-diphosphate (ADP). ATP-bound Hsp70 has low affinity for substrate, whereas the ADP-bound form has high affinity. Substrate binding to Hsp70/ATP stimulates ATP hydrolysis (6), resulting in a more stable complex of Hsp70/ADP with bound substrate. ATP hydrolysis is also stimulated by Hsp40 proteins, an evolutionary

<sup>1</sup>Department of Cellular Biochemistry, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-82152 Martinsried, Germany. <sup>2</sup>Institut für Zellbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, D-53121 Bonn, Germany.

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: [ismail@moarefi.com](mailto:ismail@moarefi.com)

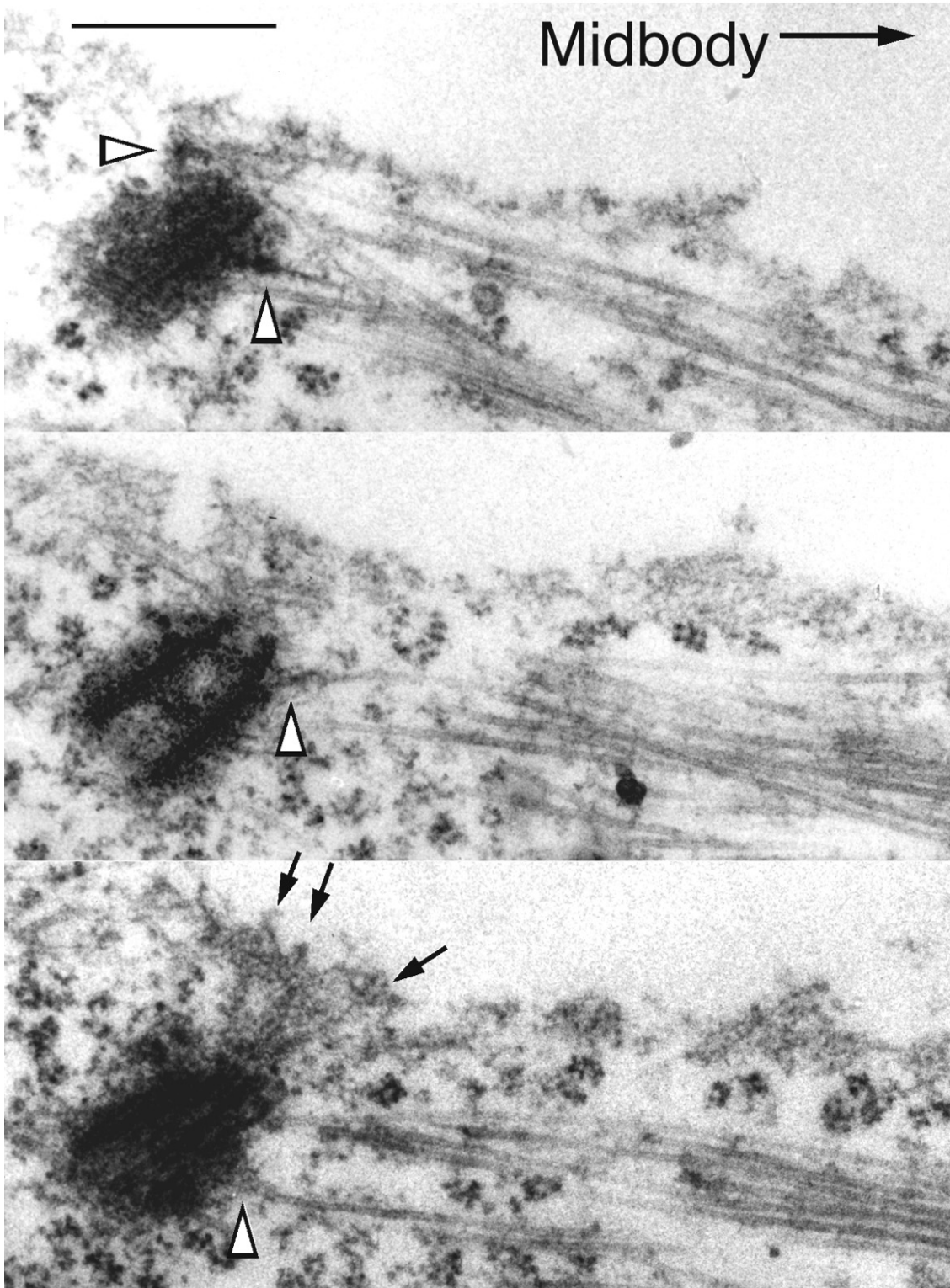
# Supplemental material



**Figure additionnelle du papier 2 :** on peut distinguer neuf faisceaux de microtubules qui partent du centriole parental (en rouge, la ninéine et en vert, la centrine). Pour adopter cette configuration, il est probable que l'aster soit sous tension. La barre en haut indique 5  $\mu\text{m}$ . La figure du bas est un détail grossi deux fois. Les flèches vertes indiquent les centrioles. Les flèches blanches montrent que des microtubules partent dans toutes les directions



## Supplemental material



**Figure additionnelle du papier 2:** Interaction du centriole parental avec le cortex cellulaire à proximité du midbody. Les têtes de flèche blanches indiquent les appendices sub-distaux sur lesquels sont ancrés des microtubules. Les flèches noires indiquent des appendices distaux qui semblent interagir avec le cortex. La barre représente 500 nm.





### **III. DISCUSSION :**

#### **1. Quelques critiques**

Le reproche majeur qu'on peut faire à ce travail, et il est de taille, concerne l'interprétation des expériences d'ablation : elles ont été faites trop tôt et on ne peut pas exclure que le défaut de cytodierèse observé ne soit pas la conséquence d'un défaut antérieur à l'abscission, par exemple au moment de la contraction du sillon de division. C'est ce qu'affirment Khodjakov et ses collègues dans leur publication sur le même sujet et dans une revue plus récente (Rieder et al., 2001) : ils pensent que le défaut primaire est un défaut d'orientation du fuseau, qui conduit à un phénotype de type 'cut' (les chromosomes sont pris dans le sillon de division). Il est connu que lorsqu'un brin d'ADN est pris dans le pont cytoplasmique qui relie les deux cellules filles, celui-ci ne se coupera pas (Mullins and Biesele, 1977). La constriction se relâche en général au bout d'une dizaine d'heures, conduisant à des cellules binucléées.

Il y a deux réponses à faire à cela.

Tout d'abord, le reproche est parfaitement justifié. Cependant, pour ce qui est des drosophiles, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de brin d'ADN pris dans le pont cytoplasmique qui relie les cellules filles, et pourtant la coupure de ce pont était retardée. De plus, le défaut de division était rarement suivi d'un relâchement de la constriction et les cellules finissaient par se couper au début de la mitose suivante. Enfin, pour ces cellules en suspension, un défaut d'orientation du fuseau n'a pas forcément grand sens. Cette expérience est tout de même critiquable, parce qu'elle fait appel à un mutant mal caractérisé, et que nous n'avons pas mis en évidence dans des cellules non mutées de drosophile le mouvement du centriole vers le midbody. Pour ce qui est de l'expérience d'ablation, nous avons demandé à plusieurs reprises à nos collaborateurs de nous indiquer s'ils pensaient qu'il pouvait y avoir un phénotype cut dans leurs cellules et il leur a semblé que non. Il est vrai que nous ne leur avons pas demandé

de réaliser une étude supplémentaire, avec de la microscopie électronique, comme cela a été fait dans le cas du travail d'ablation par laser.

La deuxième réponse concerne plutôt l'interprétation proposée pour le phénotype 'cut' observé par Khodjakov et al., qui ne me semble pas la meilleure. Il n'y a pas vraiment de raison qu'un défaut d'orientation entraîne un phénotype 'cut', puisque l'emplacement du sillon de division est dicté par les bouts plus des microtubules (Oegema and Mitchison, 1997; Savoian et al., 1999) et que de toute façon, les cellules sont souvent rondes en mitose. Il y a au moins trois autres interprétations plus satisfaisantes. Ce qui peut entraîner un phénotype cut, c'est un problème dans le mécanisme du contrôle d'assemblage du fuseau : si, par exemple, l'anaphase est déclenchée alors que les chromosomes ne sont pas parfaitement alignés. Rien ne prouve que les pôles acentriolaires soient fonctionnels de ce point de vue (et il est connu, chez la drosophile, que les mutant dans lesquels les pôles se détachent des fuseaux comme cfo pour 'centrosome fall off', ont des problèmes de dégradation de la cycline mitotique, qui a normalement lieu aux pôles, Clute and Pines, 1999; Huang and Raff, 1999; Wakefield et al., 2000). Une autre interprétation du phénotype cut, la plus simple, est que ce phénotype résulte d'un problème de migration des pôles acentriolaires et donc des chromosomes en anaphase B. En effet, il a été montré, dans l'embryon de *C.elegans*, que les pôles étaient tirés vers le cortex par l'intermédiaire des microtubules astraux (Gonczy et al., 1999), qui sont absents des pôles acentriolaires. Les cellules somatiques sont certes plus petites, et un défaut de migration pourrait être difficile à analyser. Il est cependant tout à fait envisageable qu'au moment où les cellules se réétaient sur le support, si les pôles et donc les chromosomes ne suivent pas la migration, ces derniers se trouvent pincés dans le sillon de division. Enfin, la troisième explication possible du phénotype cut est plus spéculative, elle postule l'existence d'un contrôle spatial de la position du centrosome similaire à celui de *S.cerevisiae* (Pereira and Schiebel, 2001) : imaginons que, dans les cellules animales, comme dans cette levure, le

signal de la cytokinèse soit déclenché par la proximité du centrosome et de la membrane plasmique (c'est un bon moyen de savoir que les deux pôles se sont suffisamment éloignés l'un de l'autre pendant l'anaphase B), en l'absence de centrosome, ce signal serait absent et la cytokinèse pourrait se déclencher trop tôt.

Une autre critique a été adressée au travail présenté dans le papier II : le phénomène du retournement du centriole vers le midbody n'est pas observé dans toutes les lignées cellulaires (sur une dizaine étudiées, on arrive pour le moment à peu près à cinq contre cinq). Que conclure dans ce genre de situation ? Que le phénomène observé n'est qu'une particularité ? Si on a lu ma discussion sur la phylogénie du centrosome, on saura que je ne peux pas adhérer à ce point de vue. La première chose à faire est d'essayer de chercher s'il n'y a pas d'autres différences qui caractérisent ces deux types de cellules (celles où il y a migration et celles où il n'y a pas migration). En fait, cela est déjà discuté dans le papier 2. C'est même le centre d'un bon tiers du papier : l'adhésion de la cellule à son substrat de culture influence son mode de division. Les cellules 3T3 ou L929 qui sont de type fibroblastique, sont très sensibles à la fibronectine : si la densité de fibronectine est élevée, les cellules se coupent par un mécanisme qui n'implique pas le repositionnement des centrioles, elles s'éloignent ou se rétractent et tirent sur le pont qui fini par céder sans s'être vraiment désassemblé (le faisceau de microtubules du midbody est encore tout à fait visible). J'aurais tendance à interpréter cela comme un artefact dû à une adhésion trop grande, mais c'est peut-être aussi tout simplement un autre mécanisme d'abscission. Les cellules moins adhérentes, après une période de forte activité de membrane pendant la phase d'étalement, se rétractent. Le centriole parental bouge alors très transitoirement vers le leading edge, puis part tout droit vers le midbody. Dans les cellules stimulées par des concentrations trop élevées de fibronectine, la cellule n'a pas cette rétraction et le centriole parental semble entraîné avec le leading edge. Or il se trouve que les lignées dans lesquelles le centriole parental ne se déplace pas sont tout à fait particulières

(CV1 ou Ptk2 par exemple) : elles sont extrêmement étalées (et ne bougent d'ailleurs quasiment pas mis à part pendant la phase d'étalement). Ces cellules sont très utilisées pour les études de microscopie, car leur faible épaisseur permet d'avoir peu de lumière défocalisée et peu de bruit de fond cytoplasmique.

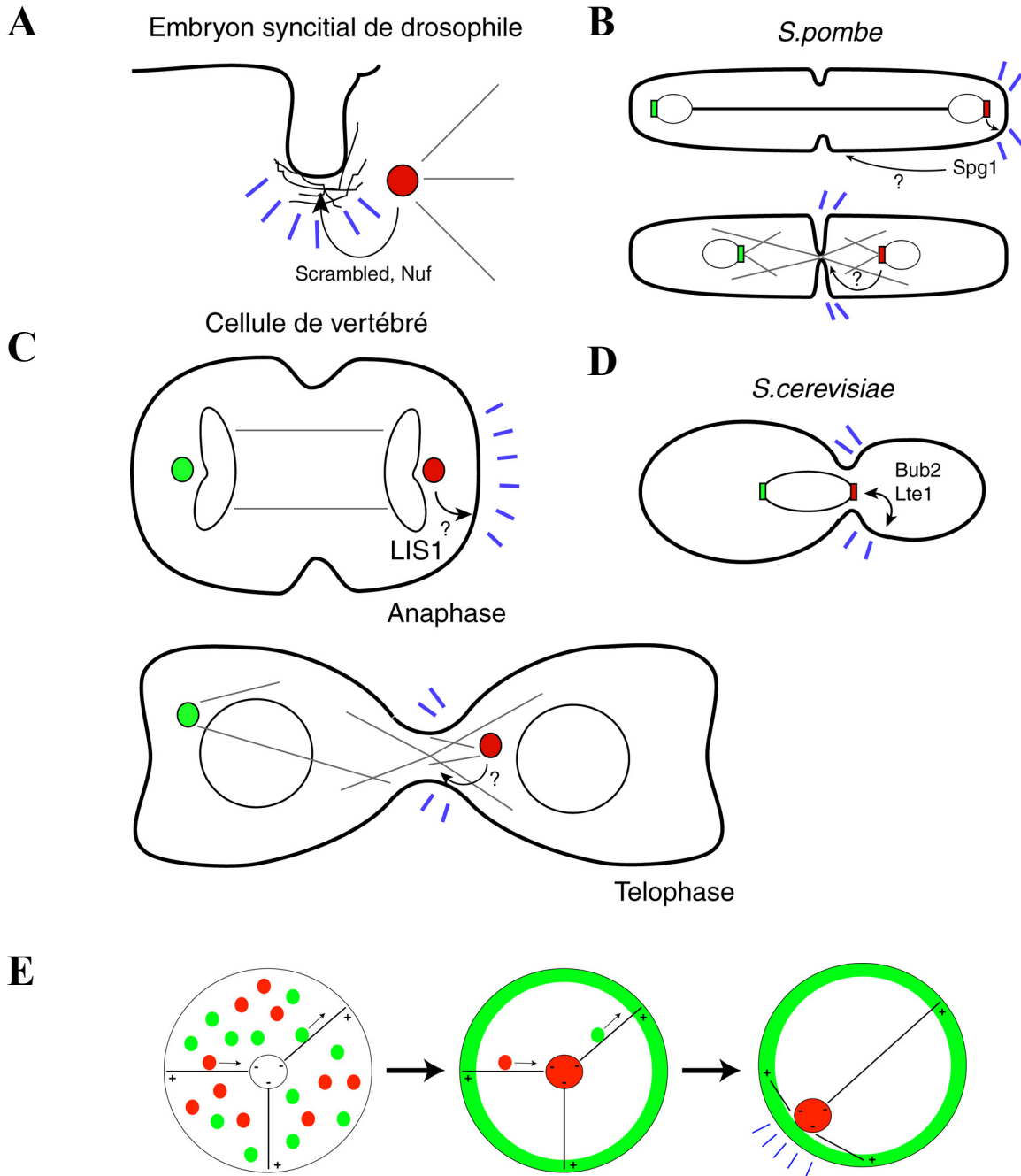
Une autre différence aurait pu être liée à l'assemblage d'un cil primaire : en effet, on pourrait penser que le mouvement du centriole parental vers le midbody n'est pas lié à la cytokinèse, mais à l'assemblage d'un cil primaire en fin de mitose (le centriole pourrait à ce moment migrer vers la membrane et s'y ancrer, puis rentrer dans la cellule en y restant accroché, pour ensuite nucléer un cil primaire). A l'inverse, on pourrait penser que le centriole parental des Ptk ne bouge pas car il est ancré à un cil primaire. Mais aussi bien les Ptk que les 3T3 ou les HeLa possèdent des cils primaires. Cependant, la nucléation des cils primaires est mal connue et elle se fait peut-être à des moments différents et selon des modalités différentes dans ces trois lignées et cela reste une piste à explorer.

Enfin, un mécanisme de contrôle peut très bien être défaillant sans qu'il y ait de phénotype, dans certaines conditions expérimentales. Tous les phénomènes de contrôle dans lesquels le centrosome peut être impliqué demanderont beaucoup de prudence et d'ingéniosité pour être mis en lumière, aussi bien pour ce qui est de la division cellulaire que pour ce qui est de la motilité. Ainsi, l'absence de phénotype lié à un défaut de nucléation des microtubules astraux dans le développement tardif de la drosophile rappelle le contrôle par Bub2 chez la levure : tant que les microtubules cytoplasmiques sont intacts, l'inactivation de Bub2 ne produit pas de phénotype. De même, tant que Bub2 est fonctionnel, une absence de microtubules cytoplasmiques (lié à un traitement avec une drogue, ou à la mutation d'une protéine d'ancrage des microtubules cytoplasmique, comme *spc72p*) provoque juste un léger retard de croissance. En revanche, les deux défauts, s'ils sont cumulés, sont léthaux (Pereira et al., 2000).

## 2. Pistes

Quelques nouveaux résultats semblent indiquer un rôle de la p160 ROCK dans le contrôle de la position du centriole parental (voir la discussion du papier I). De manière surprenante, un traitement de 40 minutes avec un inhibiteur spécifique de cette kinase, 45 minutes après un 'mitotic shake off', provoque, dans près de 60% des cellules, un mouvement des centrioles parentaux vers le midbody, alors qu'on ne trouve au même moment que quelques % des cellules non traitées dans cette configuration. L'inhibiteur de p160ROCK semble donc provoquer précocement le mouvement du centriole parental vers le midbody. Ce mouvement est suivi de l'abscission dans un laps de temps normal. En revanche, si la drogue n'est pas retirée du milieu de culture, le centriole parental ne regagne pas le centre de la cellule et continue à errer le long de la membrane plasmique. Ces résultats sont encore préliminaires, mais suggèrent que le signal qui provoque le mouvement du centriole parental vers le midbody pourrait passer par une inhibition transitoire de la p160 ROCK.

Le monastrol, un inhibiteur spécifique de la kinésine Eg5 (Kapoor et al., 2000; Mayer et al., 1999) a aussi été utilisé, dans les mêmes conditions, pour tester un rôle potentiel de cette protéine dans les mouvements post-mitotiques du centrosome, comme cela avait été proposé précédemment (Whitehead and Rattner, 1998). Après une heure de traitement, les cellules qui étaient en métaphase au moment de l'ajout de la drogue avaient toutes un fuseau monopolaires, ce qui prouvait l'efficacité de la drogue. En revanche, les cellules qui étaient déjà en anaphase au début du traitement se sont toutes divisées normalement, et le mouvement du centriole parental n'a pas été perturbé. On peut en conclure que, soit le monastrol inhibe spécifiquement l'activité de Eg5 en mitose et n'a pas d'action en cytokinèse (mais c'est peu probable), soit les résultats cités plus haut sont artefactuels (ils reposent sur l'injection d'anticorps, qui provoque facilement des inhibitions aspécifiques) et Eg5 n'a pas de rôle dans



**Figure 48: Le centrosome et le cortex**

A: Dans le syncytium de drosophile, la protéine Scrambled, concentrée au centrosome, a une action sur l'actine corticale, même en l'absence de microtubules (Stevenson et al., 2001).

B: Spg1, l'homologue chez *S.pombe* de Bub2 est aussi impliquée dans le contrôle de la sortie de mitose et est aussi localisée au SPB. Son mode d'action n'est pas connu, mais par analogie avec *S.cerevisiae*, on pourrait penser que cette GTPase est activée lors d'un contact avec le cortex, par exemple quand le SPB arrive au bout de la cellule à la fin de l'anaphase, pour signaler que les chromosomes sont bien séparés.

C: Même chose chez les vertébrés. Le papier 2 suggère l'existence d'un contrôle en fin de cytokinèse. Mais on pourrait aussi imaginer un contrôle impliquant la proximité du centrosome et du cortex en fin d'anaphase.

D: Le cas le mieux décrit, celui de *S.cerevisiae* (voir Pereira et al. 2000).

E: Un mécanisme simple de ségrégation d'une protéine et de son effecteur par des microtubules organisés en aster. Si le centre de l'aster (le centrosome) est déplacé vers le cortex, un signal peut être produit. Cela peut aussi être une source de polarisation.

le mouvement post-mitotique du centrosome. Il serait en revanche intéressant de tester le rôle de la dynéine.

Une autre piste moléculaire intéressante est celle de la protéine GAPCenA. C'est une protéine activatrice de la GTPase Rab6, concentrée au centrosome (Cuif et al., 1999). De plus, Rab6 interagit avec une kinésine qui appartient à une famille conservée chez les mammifères et chez *C.elegans*, dont tous les membres ont un rôle dans l'assemblage du fuseau central qui s'établit entre les chromosomes en anaphase et qui est nécessaire à l'abscission (Hill et al., 2000; Nislow et al., 1992; Raich et al., 1998; Savoian et al., 1999; Wright et al., 1993). Quelques expériences préliminaires d'injection d'anticorps dirigés contre GAPCenA suggèrent un rôle de cette protéine dans le contrôle du cycle cellulaire : les cellules ne se divisent qu'une fois après l'injection puis meurent ou ne se redivisent plus. La concentration de GAPCenA au centrosome suggère aussi que cette protéine pourrait avoir un rôle dans les événements liés au trafic membranaire en fin de la mitose (reformation de l'appareil de Golgi, mais aussi rôle dans la fusion de la membrane plasmique lors de l'abscission, Emoto and Umeda, 2000; Straight and Field, 2000; Umeda and Emoto, 1999).

Enfin, il serait très informatif de pouvoir observer la division de cellules dans des milieux plus physiologiques, l'idéal étant de filmer le comportement du centrosome lors de la division dans différents tissus, un milieu où la voie d'abscission par traction ne semble pas réalisable. On pourrait à défaut utiliser des systèmes comme les MDCK, ou des cellules cultivées dans des matrices extracellulaires reconstituées, 2D ou 3D, patternées avec des géométries plus ou moins contraignantes, ou encore sur des tapis cellulaires.

## **2. Le centrosome et l'espace cellulaire**

Non seulement le centrosome est un lieu où se concentrent de nombreuses activités enzymatiques - cette concentration pourrait générer des phénomènes de seuil ce qui



expliqueraient que son absence bloque le cycle de division cellulaire – mais le centrosome peut aussi être déplacé dans la cellule.

On peut relever trois cas dans lesquels ces déplacements peuvent être importants :

- 1) Pour apporter une activité enzymatique dans un endroit particulier de la cellule (la nucléation de microtubules libres par le centriole fils, les protéines Scrambled ou nuf chez la drosophile, qui sont importantes pour les mitoses sous-corticales dans le syncytium, Rothwell et al., 1998; Stevenson et al., 2001, l'évènement décrit dans le papier 2 en rapport avec la cytokinèse et enfin, l'association du centrosome avec la membrane plasmique pour l'assemblage des axonèmes).
- 2) Pour établir la position du noyau dans la cellule : on peut citer à nouveau le cas de LIS 1 dans le développement du cerveau des mammifères (Wynshaw-Boris and Gambello, 2001), le cas de la karyogamie dans les levures (Petersen et al., 1998), de la fusion des pro-nuclei lors de la fécondation ou des déplacements des noyaux dans le syncytium de drosophile (Raff and Glover, 1989).
- 3) Dans un but de signalisation, par exemple pour marquer la position du noyau - le seul cas avéré est celui de la levure *S.cerevisiae*, (Pereira and Schiebel, 2001) mais on montre sur les schémas de la figure 48 que ce genre de signalisation pourrait exister dans d'autres systèmes.

Dans la plupart des cas décrits ci-dessus, il s'agit d'un déplacement du centrosome d'une position centrale vers une position périphérique et d'une influence de la mise en présence du centrosome et du cortex. Ce contact entre le centrosome et le cortex a souvent un rôle dans des phénomènes liés à l'individuation (voir dans la partie Phylogénie, le paragraphe sur le centrosome et l'individuation p120). On peut rappeler le cas de l'embryon de drosophile traité à l'aphidicoline, des cellules lymphoblastiques traitées à la cytochalasine D, du contrôle de

sortie de mitose de *S.cerevisiae* (le 'spindle position checkpoint') ou du contrôle décrit dans le papier 2, le cas des divisions des blastomères d'échinoderme énucléés (dans tous ces exemples il s'agit de divisions cellulaires mitotiques ou amitotiques), mais aussi le cas de la karyogamie chez les levures ou de la fécondation chez les échinodermes (il s'agit dans ces deux derniers exemples d'une fusion de deux cellules).

Je voudrais aussi développer quelques cas moins bien établis : tout d'abord le cas de la levure *S.pombe*. Cette levure possède des protéines homologues des protéines impliquées dans le mécanisme de contrôle de la sortie de mitose de *S.cerevisiae*. Leurs localisations aussi sont équivalentes (SPB, septum), mais il est en général dit qu'on ne comprend pas pourquoi il faudrait contrôler la position du fuseau, puisque cette levure (appelée en anglais 'fission yeast'), contrairement à la levure de bière ('budding yeast') ne forme pas un bourgeon dans lequel il faudrait s'assurer que le noyau soit rentré avant de déclencher la fission (McCollum and Gould, 2001). En fait, c'est peut-être qu'on appelle à tort 'spindle position checkpoint' le contrôle de la levure de boulanger, car ce qui doit être vérifié dans tous les cas avant de déclencher la cytokinèse, c'est que les chromosomes sont arrivés près des pôles de la cellule tels qu'ils sont définis par l'axe du fuseau. Chez *S.pombe*, cela peut se faire en contrôlant que le centrosome est arrivé près de la région du cortex avec laquelle ont interagi, pendant la métaphase, les microtubules aстраux. Cela vaut aussi bien pour les deux types de levures que pour les cellules de métazoaires et probablement pour toutes les cellules eucaryotes (voir la figure 48). On a évoqué une hypothèse de ce type pour expliquer l'absence de phénotype lié à l'annulation du gène *cnn* sur le développement tardif de drosophile (p 97). Il est intéressant de noter que, aussi bien pour *S.cerevisiae* et *S.pombe* que pour les vertébrés, il a été remarqué une asymétrie entre les deux pôles dans leur activité liée au contrôle de sortie de mitose (Cerutti and Simanis, 1999; Menssen et al., 2001; Pereira and Schiebel, 2001; Pereira et al., 2001; Segal and Bloom, 2001; Yeh et al., 2000). Cette asymétrie peut se comprendre chez

*S.cerevisiae* qui a une division asymétrique à cause de son mode même de division par bourgeonnement (et cette division asymétrique s'accompagne d'une réelle asymétrie entre les cellules filles, pour la détermination de leur type sexuel par exemple). Dans les deux autres cas, cela est moins clair.

Chez certains flagellés, les centrioles restent au cortex, mais ils sont toujours reliés aux pôles du fuseau par des fibres contractiles qui se rétractent en sortie de mitose. Un article récent décrit un mouvement transitoire des centrioles - cette fois du cortex vers le noyau - pour établir un lien entre ces organites et déposer de la centrine aux pôles du fuseau (Lechtreck and Grunow, 1999 et communication personnelle de KF Lechtreck).

Un autre cas peu connu est celui des fusions de cellules somatiques lors de certaines différenciations cellulaires comme celles qui conduisent à la formation de myotubes ou de cellules polynucléées géantes comme les ostéoclastes (Moudjou et al., 1989; Tassin et al., 1985). Le centrosome joue t-il un rôle dans ces fusions ? Joue t-il un rôle aussi dans les divisions amitotiques qui permettent de reformer des monocytes à partir des cellules géantes ? Enfin, il existe un cas de syncytium dans la production des gamètes de mammifère : lors de la spermatogénèse, les cellules en différenciation restent associées suite à une cytokinèse interrompue. Dans chaque cellule, les centrioles restent localisés à proximité du pont intercellulaire dont la division a été interrompue et le flagelle s'assemble donc aussi dans cette zone (Clerot, 1971 et voir la figure 39). Des images données en annexe au papier 2 montrent que le centriole parental quand il va, à la fin de la cytokinèse, vers la pièce intermédiaire (midbody), semble s'associer à la membrane plasmique par ses appendices distaux.

On retrouve bien à travers tous les cas évoqués ci-dessus le rôle d'intégrateur au sens de l'intégrité : tenir ensemble le cortex et le noyau, coupler la mitose et la cytodierèse (voir la partie Phylogénie où cet argument est présenté d'une autre manière). Il semble que pour

réaliser ces couplage, le corpuscule central soit associé à des activités qui ont une influence sur le cortex.

On peut imaginer un modèle très simple lié aux propriétés des microtubules : le centrosome regroupe en général les bouts moins des microtubules alors que le cortex est plutôt associé aux bouts plus. Ainsi, il est aisé de ségréger une enzyme de son effecteur, en associant l'un aux bouts moins et l'autre aux bouts plus (voir la figure 48). Un mouvement du centrosome vers le cortex permettra de mettre en présence les deux protéines ségrégées et de produire un signal.

De quoi s'agit-il dans toutes ces situations ? Il s'agit en quelque sorte 'd'incarner' un réseau biochimique. Par exemple, la flèche qui, sur une représentation classique, montrerait l'activation de Bub2 par Lte1 (dans le contrôle de sortie de mitose de *S.cerevisiae*) ne dit en fait pas grand chose du mécanisme de contrôle (Bub2 est localisé au SPB et Lte1, son effecteur, est associé au cortex du bourgeon). Si les réseaux biochimiques peuvent donner une idée du temps (par les constantes de réaction), ils ne donnent aucune idée de l'espace, et c'est sûrement pour cela que les techniques de modélisation de réseaux biochimiques n'ont jusqu'à présent été fructueuses que dans la bactérie - même dans la bactérie, il semblerait qu'il faille tenir compte de l'espace pour expliquer certains phénomènes d'amplification (Bray et al., 1998; Duke and Bray, 1999; Shimizu et al., 2000 et Jacobs et al., 1999; Losick and Shapiro, 1999; Shapiro and Losick, 1997; Shapiro and Losick, 2000; Wheeler and Shapiro, 1999) - ou dans des systèmes liés à la production d'ATP qui sont délocalisés. La production d'énergie par glycolyse fournit un exemple très intéressant. Des cribles génétiques avaient permis de décrypter à peu près tout le réseau métabolique. Mais il est alors apparu qu'il devait manquer quelque chose, car ce réseau avait une particularité : il s'amorçait en consommant de l'énergie, pour ensuite en produire plus qu'il n'en avait consommé. Mais, tel que le réseau semblait conçu, l'étape d'amorçage pouvait, si trop de nutriment était fourni après une période

de déprivation, conduire à épuiser le stock d'ATP avant d'en avoir produit, car la production d'ATP était une étape limitante (elle se produit moins vite que l'amorçage). Or les bactéries ne meurent pas si on les soumet à ces conditions. Ainsi des chercheurs eurent l'idée de trouver des mutants qui meurent si on leur donne trop de glucose après une période de déprivation. Ils trouvèrent un gène dont le produit assure un rétrocontrôle qui inhibe l'étape d'amorçage quand le produit intermédiaire qui précède l'étape limitante s'accumule. Cet exemple est intéressant, parce qu'on voit qu'une protéine de contrôle peut passer tout à fait inaperçue si on ne trouve pas les bonnes conditions expérimentales pour la mettre en valeur (les chercheurs qui pensent que le centrosome ne sert à rien dans la cytokinèse ou le mouvement cellulaire sous prétexte que quand ils l'enlèvent la cellule peut se couper et se déplacer auraient sans doute dit de cette protéine qu'elle ne servait à rien dans le métabolisme de la bactérie). Le deuxième exemple intéressant que fournit la glycolyse illustre l'importance de l'espace (et de la phylogénie) : il existe des organismes qui ne possèdent pas ce gène de régulation de la glycolyse et qui se débrouillent très bien sans lui. Mais leur glycolyse a lieu dans un compartiment particulier appelé le glycosome (les euglénobiontes kinétoplastidés, comme les trypanosomes). C'est le contrôle de la concentration d'ATP dans ce compartiment qui assure le rétrocontrôle décrit plus haut (Bakker et al., 2000) : si la réaction d'amorce va plus vite que la réaction qui produit l'ATP, la concentration d'ATP diminue dans le compartiment et la réaction d'amorçage, qui consomme de l'énergie, s'arrête le temps que soit reproduit de l'énergie par la consommation du produit intermédiaire. Quand la concentration d'ATP dépasse un certain seuil, l'ATP est pompé hors du glycosome et utilisé par la cellule. On peut en conclure que des organismes différents adoptent des solutions très différentes à un même problème – ce n'est pas parce que la protéine de régulation est absente chez certains organismes qu'elle n'est pas importante chez d'autres – et que des organisations spatiales particulières (comme la compartimentalisation) peuvent jouer le rôle tenu dans d'autres

systemes par une protéine régulatrice. Dans les deux cas, il s'agit d'une boucle de rétroaction d'un réseau biochimique, 'incarné' différemment.



## **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**





## **I. DEFINITION(S) DU CENTROSOME.**

Cette partie a pour but de rassembler les conclusions qui parsèment cette thèse.

On a cherché à aborder le centrosome sous plusieurs angles pour à chaque fois se convaincre un peu plus de l'importance de certains aspects qui sont devenus presque des leitmotifs.

L'approche historique de l'introduction nous a permis de désigner quelques uns des pièges de ce champs de recherche qui a toujours une double dynamique : l'une faite de fascination et l'autre de désillusions. La fascination s'est souvent accrochée à des images : la position du centrosome au centre de la cellule ou aux pôles du fuseau, son association avec des fibres radiales et surtout la fascination pour la structure centriolaire. Les désillusions et les méfiances sont souvent à l'image de ces fascinations : elles ne font que révéler la conception schématique et naïve que l'on pouvait se faire du centrosome. Ainsi, l'observation du centrosome dans de nombreuses cellules avait fini par en faire, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, un organe universel. Sa position aux pôles du fuseau en avait aussi fait 'l'organe de division' et sa position au centre de la cellule lui fit porter la responsabilité d'établir la polarité cellulaire. Ainsi, quand on s'aperçu que les cellules de plante n'avaient pas de centrosome, tout s'écroula une première fois et on douta même de son existence (voir le schéma de la cellule de Wilson en 1925, le centrosome est représenté par deux petits points excentrés). La microscopie électronique le remit sur le devant de la scène : il contenait des corpuscules, les centrioles, qui, en plus d'être très esthétiques, étaient parfaitement identiques aussi bien chez les plantes que les protistes ou les métazoaires. Mais encore une fois, il fallut se rendre à l'évidence, on n'arrivait pas à en donner une définition universelle. Alors apparut le MTOC et le centrosome s'éclipsa de nouveau jusqu'à ce que, récemment, la génétique et la biologie moléculaire le replacent dans l'ordre des objets biologiques. En effet le principal écueil, qui a

fait du centrosome le lieu de toutes les contradictions, fut que sa composition moléculaire, pour des raisons techniques, était restée très longtemps – et elle l’est encore en grande partie – méconnue. Ainsi, le centrosome est resté un corpuscule dont la gloire passée encourageait la suspicion : ne surtout pas se laisser abuser par ses atours ! Mieux vaudrait risquer de passer à côté de quelque chose d’intéressant - et prendre un air profond pour dire qu’il ne s’agit peut-être, après tout, que de corrélations - que de risquer de passer pour un naïf. De plus, cette faiblesse des connaissances moléculaires force souvent à parler du centrosome comme d’un objet particulier (le centrosome fait ceci ou cela ou ne le fait pas), ce qui n’est pas bien vu au temps des molécules.

On a pu, dans un deuxième temps, définir clairement le centrosome des vertébrés par la présence de centrioles et, à partir de cette définition, le caractériser avec plus de précision en décrivant son mode de reproduction par duplication couplé au cycle cellulaire ou par assemblage *de novo* dans des voies de différenciation. Enfin, on a pu énumérer un certain nombre de ses composants moléculaires ainsi que quelques mécanismes dans lesquels il semble jouer un rôle.

Dans un troisième temps, en distinguant un certain nombre de caractères liés à son mode de reproduction par duplication et à son rôle dans l’organisation des microtubules, nous avons pu définir un centrosome dans d’autres espèces dépourvues de centrioles. Cela nous a permis d’effectuer un certain nombre de comparaisons et de dégager quelques principes pour comprendre la place que tient cet organite dans l’organisation cellulaire chez les eucaryotes. Ainsi nous avons pu revenir après un long détour d’un peu plus d’une centaine de pages à une reformulation de la définition de Boveri - un organite qui lie la division nucléaire à la division cytoplasmique : le centrosome assure l’intégrité des organes moteurs, génétiques et de fission. Nous avons ensuite présenté deux travaux qui, à l’aide d’une étude cinématique du comportement des centrioles ont permis d’aborder avec un nouveau regard les deux anciennes

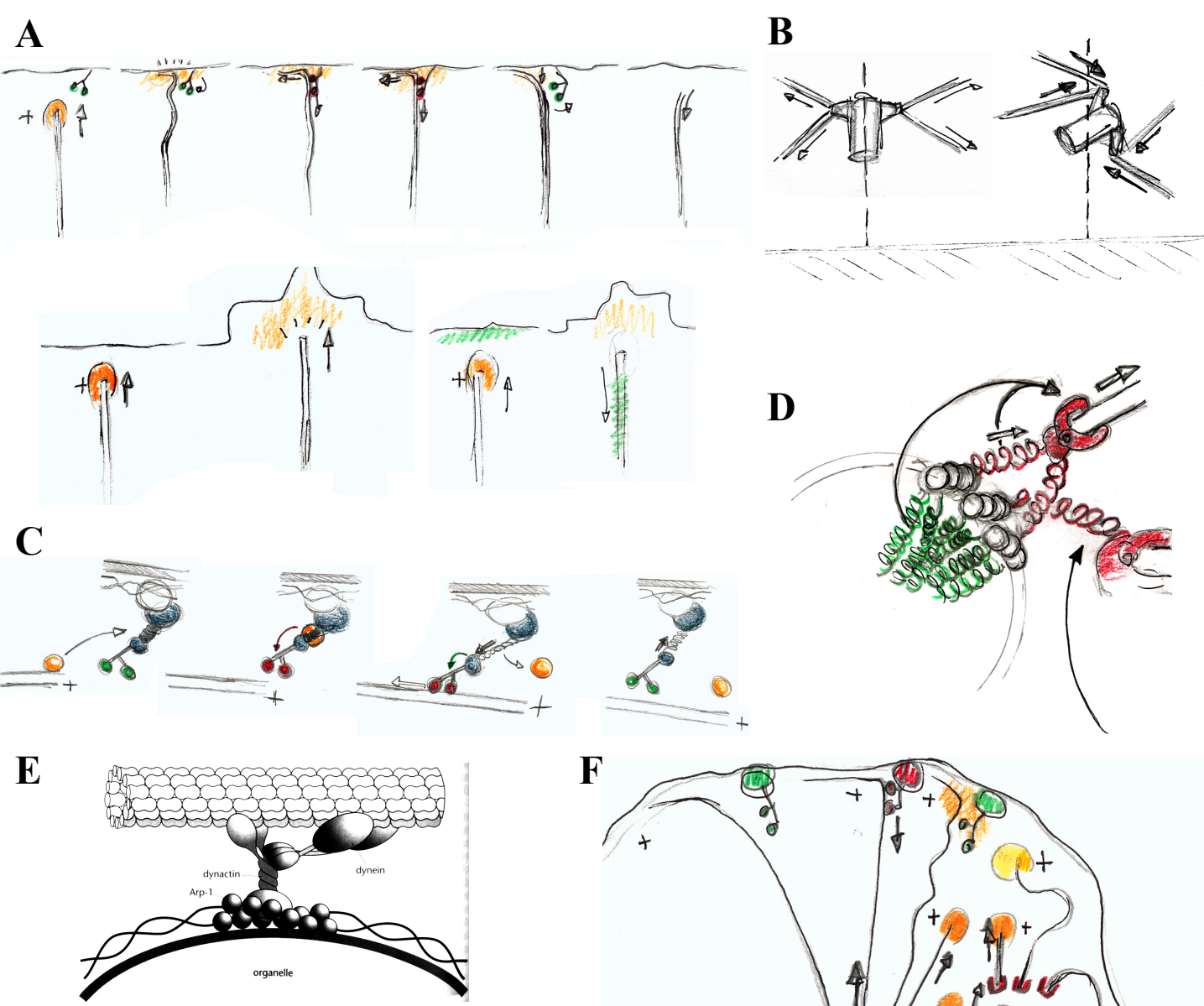
idées du rôle du centrosome dans la motilité et dans le cycle de division cellulaire. Nous avons pu proposer que la régulation de la distance intercentriolaire et la nucléation de microtubules par le centriole fils aient un rôle dans la régulation du réseau microtubulaire. Nous avons aussi proposé que la position du centriole parental aie un rôle dans le contrôle de l'abscission.

Quel est l'écueil à venir : oublier que le centrosome est un corpuscule, c'est à dire une entité cohésive dans la cellule qu'il faut considérer comme un tout si on veut comprendre son intérêt pour l'économie cellulaire. Oublier aussi qu'il est au centre de l'aster de microtubules et qu'il est aux pôles du fuseau mitotique. Car tout son intérêt réside en cela : c'est un corpuscule gros à l'échelle moléculaire et petit à l'échelle de la cellule, mais toujours accessible grâce aux microtubules et qui peut être déplacé dans l'espace cellulaire. Le centrosome est donc avant tout un endroit particulier dans la cellule, et il peut rester un endroit particulier et ne pas se disperser grâce à sa cohésion. C'est donc dans des questions d'ordre spatial que son importance peut être mise à jour, en tant que centre non seulement géométrique (le bout moins des microtubules), mais aussi dynamique (forces exercées par les microtubules) et enfin biochimique (lieu de nœud dans des réseaux biochimiques, rôle de scaffold géant, ou de commutateur spatial ou temporel).

## **II. QUE VEUT DIRE 'FONCTION' DU CENTROSOME ?**

### **1. Une définition**

Pour clarifier ce qu'on nomme une fonction, on peut dire que c'est une question d'échelle. La fonction est toujours l'attribut d'un élément pris par rapport à un mécanisme dont il est un maillon. Ainsi les fonctions du centrosome concernent des mécanismes qui se produisent à



**Figure 49: Quelques mécanismes imaginaires**

A: Interactions d'un microtubule avec le cortex. La boule orange indique la présence de complexes de bout plus. Une dynéine activée par ces complexes tire sur le microtubule puis le relâche. En dessous, l'action d'un microtubule sur le cortex peut être due à un apport de protéines transportées vers le bout plus ou à une déplétion par un transport vers le bout moins.

B: Un centriole sous tension aurait plus de chance d'être perpendiculaire au substrat qu'un centriole sous compression.

C: Un complexe de bout plus apporté par un microtubule active une dynéine qui tire sur le microtubule. La tension déforme le complexe régulateur de la dynéine, qui relâche l'activateur et la dynéine lâche le microtubule.

D: Les protéines à domaine coiled-coil du centriole peuvent aussi être des mécanosenseurs (par exemple ici la ninéine qui ancre les microtubules). La centrine (en vert) pourrait aussi agir comme un mécanosenseur si sa liaison au calcium par exemple est régulée par sa déformation

E: Le complexe dynéine/dynactine ancré à une membrane et interagissant avec un microtubule (d'après Bray, 2001).

F: Un peu tout en même temps.



l'échelle de la cellule, de même qu'un type cellulaire peut avoir une fonction à l'échelle de l'organisme et qu'un résidu chimique peut avoir une fonction à l'échelle d'une molécule. Certaines protéines ont des fonctions à l'échelle du centrosome, comme la nucléation des microtubules, qui n'est pas en ce sens une fonction centrosomienne. Il faut bien préciser que la nucléation aurait pu être une fonction centrosomienne et qu'il était légitime de le supposer tant que le mécanisme était inconnu. On pouvait supposer que la nucléation des microtubules était un mécanisme suffisamment complexe pour nécessiter une petite usine de la taille du centrosome (ou des amorces de microtubules constitués par les parois des centrioles). La raison pour laquelle ce n'est pas une fonction centrosomienne, c'est que c'est une propriété du centrosome qui en est isolable, qui est donc attribuable à une sous-partie du centrosome et qui peut fonctionner indépendamment des autres parties. On comprend que si cette modularité concerne presque toutes les propriétés du centrosome, il faudra chercher les fonctions du centrosome lui-même dans l'importance que peut avoir dans l'économie cellulaire le fait de regrouper toutes ces propriétés dans un même organite, c'est à dire en un même lieu. Pour reprendre l'exemple de la nucléation des microtubules, une fonction centrosomienne pourrait être la régulation spatio-temporelle de cette nucléation en fonction d'un certain nombre de paramètres cellulaires.

## **2. Un modèle purement spéculatif : le centrosome mécanosenseur**

Si on s'interroge sur les fonction spatiales du centrosome, on réalise assez vite que cet organite, vu sa taille, a peu de chances de s'orienter grâce à un gradient de molécules. En revanche, il n'y a pas de restriction de ce genre s'il s'agit de s'orienter en fonction des forces qui s'exercent sur lui (il n'y a pas de phénomène de diffusion et le point d'application de la force peut être aussi petit qu'une unique molécule). La structure des centrioles est de ce point

de vue source d'inspiration, avec sa symétrie cylindrique et ses bras qui ancrent les microtubules.

On peut donc imaginer que ces bras soient des mécanosenseurs et que le centriole parental qui les porte puisse ainsi percevoir les moindres déformations de la cellule et leur répartition spatiale pour réagir en conséquence. De plus l'environnement du centriole, la matrice péricentriolaire, est très particulière : elle ancre de nombreuses activités enzymatiques associées aux principales voies de transduction. Ainsi le centriole peut aussi être 'informé' de l'état général de la cellule (a t-elle reçu un signal mitogénique, un signal de différenciation, un signal de polarisation ou de migration ?), et il peut même vraisemblablement estimer globalement l'intensité de ce signal, grâce aux molécules transportées par les microtubules depuis tous les points de la cellule (et en particulier de la périphérie cellulaire).

Mais pour que le centriole soit sensible aux déformations, il est beaucoup plus avantageux qu'il soit sous tension de la part des microtubules. Ainsi, il y a en permanence un lien mécanique direct entre les divers points de la membrane plasmique et les bras du centriole parental.

A ce propos, il est étonnant de constater que beaucoup de gens sont encore convaincus que le centrosome se place au milieu de la cellule par une action de répulsion des microtubules sur la membrane plasmique, alors qu'expérimentalement tout tend à prouver qu'au contraire les microtubules sont tirés par le cortex, à part dans la levure *S.pombe*, où il semble que les microtubules puissent pousser sur les parois. En fait, l'origine de ce paradigme vient d'une expérience dans un système simplifié de microtubules ancrés sur un corpuscule artificiel et placés dans une chambre en verre, assortie d'un modèle théorique sur le centrage d'un tel corpuscule par l'action des microtubules (Holy et al., 1997). L'argument choc était qu'il n'y a 'pas besoin' de moteurs pour expliquer le centrage. On peut se reporter à la fin de la partie Phylogénie pour une discussion de ce 'il n'y a pas besoin' qui correspond à une idée fautive de

ce que sont les systèmes biologiques. En fait, la membrane plasmique est bien différente d'une paroi en verre et les bouts plus des microtubules sont pris en charge par de nombreux complexes contenant souvent de la dynéine.

Donc, à part pour la levure *S.pombe* et peut-être un certain nombre d'autres cellules à paroi rigide (les cellules somatiques de plante), toutes les données expérimentales vont dans le sens d'une tension exercée par les microtubules sur le centrosome, via des dynéines corticales (pour une revue récente voir Bloom, 2001). On peut rappeler les cas où cela a été montré explicitement : l'anaphase B dans l'embryon de *C.elegans* (Gonczy et al., 1999), les mouvements du noyau de *S.cerevisiae* (en mitose ou en interphase, Adames and Cooper, 2000; Carminati and Stearns, 1997; Yeh et al., 2000), et les mouvements du centrosome en interphase chez l'amibe *Dictyostelium* (Koonce et al., 1999; Neujahr et al., 1998). On peut aussi considérer comme directes les preuves d'un positionnement du fuseau ou du noyau dépendant de la dynéine : positionnement du fuseau dans des cellules de mammifère en culture (Busson et al., 1998; O'Connell and Wang, 2000), migration du noyau pendant le développement neuronal (Wynshaw-Boris and Gambello, 2001), mouvement du centrosome dans le wound-healing (Palazzo et al., 2001), et encore bien d'autres cas.

Les physiiciens objecteront immédiatement que ce système sous tension est instable. C'est oublier qu'un système à priori instable peut être stabilisé par un système de rétrocontrôle (comme pour un avion-aile) et que le centrosome contient suffisamment de molécules diverses pour qu'un tel système existe. De plus le rétrocontrôle peut aussi avoir lieu à la membrane : le système de dynéine corticale ne tire que pendant un temps très bref sur chaque microtubule. Ainsi, le travail de Koonce et al. montre bien que le système est sous tension et que les microtubules sont capturés puis relâchés au bout de quelques secondes. Il fournit aussi une autre clé pour comprendre la stabilité du système : si suffisamment de microtubules sont ancrés à chaque instant, la traction transitoire de l'un d'entre eux ne va pas trop déstabiliser



l'ensemble. Mais si les interactions des microtubules avec le cortex sont perturbées, il peut arriver qu'un seul microtubule soit capturé et qu'il tire alors le centrosome jusqu'au bord de la cellule.

Ce qu'on peut imaginer au niveau du centrosome est tout aussi simple : quand il est tiré plus fort dans une direction, soit il relâche les microtubules dans cette direction pour rester au centre, soit il en capture de plus nombreux dans la direction où ça tire et il est entraîné dans cette direction.

Une autre question est celle du recentrage quand il n'est plus au centre : si on pense que plus le centrosome est près de la membrane, plus les microtubules sont associés sur une grande longueur avec la membrane et donc plus ils tirent fort, le centrosome peut trouver le centre en relâchant les microtubules du côté où ça tire le plus jusqu'à que ça tire autant dans toutes les directions et alors il applique la même stratégie s'il veut rester au centre ou bien fait l'inverse s'il veut le quitter (tout cela est très schématique et en fait, il suffirait d'un mécanisme qui lâcherait les microtubules au-dessus d'un certain seuil et que ce mécanisme puisse être inhibé au niveau cellulaire, il n'y a pas besoin de mécanisme de comparaison des tensions).

J'écris 'veut' mais c'est évidemment l'état global de la cellule qui en décide, c'est à dire les signaux cytoplasmiques du moment : par exemple, la cellule migre, le centrosome reste au centre en relarguant des microtubules vers l'arrière ou bien en ancrant plus de microtubules vers l'avant, pour compenser le fait qu'il a tendance à se rapprocher de l'arrière. En fin de mitose (papier 2), il pourrait s'équilibrer jusqu'à ce qu'un signal cytoplasmique lui fasse changer de régime. Il partirait alors automatiquement dans la direction où ça tire le plus (vers le midbody puisque beaucoup de microtubules y sont stabilisés).

La p160 ROCK, qui régule la position du centriole parental, est un bon candidat pour cette régulation, ainsi que la ninéine, qui est concentrée au niveau des appendices sub-distaux qui ancrent les microtubules. Les signaux pourraient aussi être calciques (la centrine sert entre

autre dans les flagelles à couper l'axonème dans certains mécanismes de protection, elle pourrait servir à couper les microtubules associés aux bras sub-distaux, puisqu'elle est localisée du côté du centriole où se trouvent ces bras). De même, le lien intercentriolaire semble réagir à l'inhibition de la p160 ROCK ainsi qu'à des signaux calciques (ce qui n'est pas étonnant, puisque la calmoduline pourrait réguler le domaine d'interaction avec les centrioles d'une des protéines majoritaires de la matrice, l'AKAP 450).

### **3. Dans quels systèmes expérimentaux étudier les fonctions du centrosome ?**

Puisque le centrosome semble impliqué dans des mécanismes de contrôle, si on veut les mettre en évidence, il faut soit pouvoir faire des mesures quantitatives, soit se placer dans des conditions qui permettent de mettre en évidence l'absence de contrôle quand le centrosome est perturbé ou absent, c'est à dire dans des conditions dans lesquelles on teste la robustesse du système par des perturbations.

Un bon paramètre à mesurer est la quantité de microtubules nucléés (ce qui est possible grâce à la protéine EB1 couplée à la GFP), l'idéal serait de pouvoir aussi savoir combien de microtubules sont relâchés. On pourrait imaginer que le bout plus d'un microtubule relâché puis transporté par des moteurs de bout plus aille plus vite que le bout plus d'un microtubule qui ne fait que s'assembler, ce qui permettrait de déterminer la quantité de microtubules relâchés.

Il faudrait regarder ces paramètres dans des conditions d'activation de la migration pour estimer s'il y a, par exemple, une modification de la nucléation. Tous ces paramètres pourraient être ensuite comparés à ceux mesurés après ablation du centrosome, pour pouvoir estimer des différences quantitatives. Au niveau qualitatif, on a déjà discuté des expériences à faire pour tester par exemple la robustesse de la migration, avec ou sans centrosome (mettre la

cellule dans des situations de conflit). Cela pourrait aussi être réalisé pour le cycle cellulaire en soumettant la cellule à des sollicitations contradictoire en présence ou en absence de centrosome. Il est connu que certains signaux contradictoires entraînent l'apoptose. Cette activation de l'apoptose aurait-elle toujours lieu en absence de centrosome ?

L'autre type d'expérience à faire pour tester une réponse active du centrosome consisterait à le déformer, soit *in vitro* en tirant spécifiquement sur des protéines (grâce à un microscope à force atomique dont la pointe serait couplée à des anticorps), soit en déformant la cellule. Si le modèle présenté plus haut est juste, une déformation de la cellule devrait avoir des conséquences observables au niveau du centrosome, comme l'accumulation ou le relargage d'une protéine (la  $\gamma$ -tubuline, ou la calmoduline) ou sa modification. Cela pourrait être mesuré par vidéomicroscopie à l'aide de protéines fluorescentes. Une mesure plus précise de la modification d'une interaction entre deux protéines pourrait être effectuée à l'aide de la technique dite de FRET (transfert d'énergie entre fluorochromes très proches). Si une grande quantité de cellules pouvaient être étirées en même temps, on pourrait chercher à détecter en biochimie, un changement de l'état de phosphorylation d'une protéine.

Enfin, une bonne expérience à faire avec un laser serait par exemple de couper les microtubules ancrés sur un centriole, sur un certain secteur angulaire. S'il existe une réponse active, le centrosome devrait d'abord être entraîné du côté opposé à la coupure puis relâcher les microtubules du côté opposé. L'effet pourrait être suffisamment important pour que cela se voit tout simplement grâce à un marquage des microtubules (tubuline rhodamine ou tubuline GFP). On pourrait aussi simplement observer le recentrage d'un centrosome dans une cellule traitée longtemps au nocodazole – il y aura peut-être une première phase d'entraînement vers le bord, suivie d'une phase d'éloignement du bord.

Pour terminer, je voudrais reprendre une citation placée par André Lwoff en exergue de son livre sur la morphogénèse des ciliés :

« Il y a lieu de se flatter que ces découvertes produiront plusieurs bons effets. Elles doivent naturellement nous jeter dans une grande défiance à l'égard de ces règles générales, auxquelles, si je puis parler ainsi, on a prétendu borner la nature et qui ne peuvent servir qu'à mettre obstacle à nos connaissances. »

Cette citation est tirée des 'Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de Polype d'eau douce à bras en forme de cornes.' de A. Trembley, J. et H. Verbeeck, éd. Leiden, 1744.

A part l'allusion aux cornes qui est probablement, de la part de André Lwoff, une finesse tout à fait privée, je pense que la petite histoire des centrioles au XXI<sup>ème</sup> siècle rapportée dans ce mémoire, de même que celle des polypes d'eau douce au XVIII<sup>ème</sup>, est à la fois tout à fait futile et immensément importante.



## **ANNEXES**



## **ANNEXE I : LE ROLE DE LA NINEINE DANS L'ANCRAGE DES BOUTS MOINS DES MICROTUBULES.**

### **1. Résumé :**

L'existence d'un complexe d'ancrage des microtubules, complémentaire du complexe de nucléation, a été proposée à la suite d'expériences réalisées sur des cellules épithéliales de la cochlée. Le travail publié dans cet article fournit des indications sur un composant potentiel de ce complexe d'ancrage : la ninéine. Cette protéine est localisée, dans des cellules de souris de type fibroblastique, au niveau de l'extrémité proximale des deux centrioles (c'est à dire aux bouts moins des microtubules centriolaires) et est particulièrement enrichie au niveau des appendices subdistaux du centriole parental, sur lesquels sont ancrés les microtubules de l'aster. La protéine se redistribue sur les deux centrioles au cours de la phase S, et forme un halo autour de chaque paire de centrioles en G2, ce qui correspond à la phase où le centriole fils se met à ancrer des microtubules lui aussi. En G1, les microtubules ancrés sur les appendices sub-distaux sont résistants au nocodazole. Dans les cellules épithéliales de la cochlée, la ninéine se relocalise, au cours de la différenciation, du centrosome vers la membrane plasmique apicale, où s'assemblent des faisceaux de plusieurs milliers de microtubules. Il semble que des amorces de microtubules associées à la ninéine soient transportés au cours de ce processus. De plus, la ninéine ne semble pas impliquée dans le processus de nucléation des microtubules. Il est finalement proposé que la ninéine soit une protéine d'ancrage et de stabilisation des bouts moins des microtubules.



## **2. Papier 3 : Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites : the role of ninein**

Le rôle de la ninéine dans l'accrochage des microtubules non seulement au centrosome mais aussi sur d'autres structures cellulaires

## Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein

Mette M. Mogensen<sup>1,\*</sup>, Azer Malik<sup>1</sup>, Matthieu Piel<sup>2</sup>, Veronique Bouckson-Castaing<sup>2</sup> and Michel Bornens<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy and Physiology, MSI/WTB complex, Dow Street, University of Dundee, Dundee, DD1 5EH, UK

<sup>2</sup>Institute Curie, UMR 144-CNRS, 26 Rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

\*Author for correspondence (e-mail: m.m.mogensen@dundee.ac.uk)

Accepted 14 June; published on WWW 9 August 2000

### SUMMARY

The novel concept of a centrosomal anchoring complex, which is distinct from the  $\gamma$ -tubulin nucleating complex, has previously been proposed following studies on cochlear epithelial cells. In this investigation we present evidence from two different cell systems which suggests that the centrosomal protein ninein is a strong candidate for the proposed anchoring complex.

Ninein has recently been observed in cultured fibroblast cells to localise primarily to the post-mitotic mother centriole, which is the focus for a classic radial microtubule array. We show here by immunoelectron microscopical analyses of centrosomes from mouse L929 cells that ninein concentrates at the appendages surrounding the mother centriole and at the microtubule minus-ends. We further show that localisation of ninein in the cochlear supporting

epithelial cells, where the vast majority of the microtubule minus-ends are associated with apical non-centrosomal sites, suggests that it is not directly involved in microtubule nucleation. Ninein seems to play an important role in the positioning and anchorage of the microtubule minus-ends in these epithelial cells. Evidence is presented which suggests that ninein is released from the centrosome, translocated with the microtubules, and is responsible for the anchorage of microtubule minus-ends to the apical sites. We propose that ninein is a non-nucleating microtubule minus-end associated protein which may have a dual role as a minus-end capping and anchoring protein.

Key words: Microtubule, Centrosome, Cochlea, Epithelial cell

### INTRODUCTION

Microtubules are essential for many cellular functions including vesicle transport and cell motility, polarity and division. The precise and intricate microtubule patterns deployed in cells are important for these microtubule-dependent processes, and ultimately for normal cell function. The molecular mechanisms responsible for microtubule distribution and maintenance remain to be fully defined. The temporal and spatial organisation of microtubules is at least in part defined by the microtubule-organising centre. In most animal cells, microtubules radiate from a centrally located centrosomal nucleating centre, which consists of a pair of centrioles and pericentriolar material (Bornens, 1992; Bornens and Karsenti, 1984; Brinkley, 1985; Kellogg et al., 1994; McIntosh and Euteneuer, 1984). Microtubules are nucleated by  $\gamma$ -tubulin complexes within the pericentriolar material and elongation occurs by plus-end addition of heterodimers of  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin (Berns and Richardson, 1977; Gould and Borisy, 1977; Oakley and Oakley, 1989). The minus-end of a microtubule is usually anchored in the pericentriolar material, but whether it remains associated with the  $\gamma$ -tubulin complex once nucleated remains to be resolved (McIntosh and Euteneuer, 1984; Shu and Joshi, 1995).

Many differentiated cells including polarised epithelial cells such as intestinal, kidney, retinal pigmented, hepatocyte and certain mammalian cochlear cells display non-centrosomal non-radial microtubule arrays (Achler et al., 1989; Bré et al., 1987, 1990; Gilbert et al., 1991; Ihrke et al., 1993; Meads and Schroer, 1995; Rizzolo and Joshi, 1993; Trout and Burnside, 1988; Tucker et al., 1992, 1995; see also Mogensen, 1999). Here the majority of the microtubules are associated with the apical cell surface while relatively few radiate from the centrosome. Studies until recently have suggested that nucleating material relocates to the apical cell surface of polarised epithelial cells where it provides new sites for microtubule nucleation (Bré et al., 1990; Tucker et al., 1992, 1995). More recently, further evidence from studies on cochlear epithelial cells suggests that centrosomal nucleation is retained in these cells and that a microtubule release and capture mechanism is responsible for the construction of the apical cell surface associated non-radial microtubule arrays (Mogensen et al., 1997; Mogensen, 1999).

Epithelial cells of the mammalian cochlea provide an ideal opportunity to study microtubule nucleation and anchorage during tissue morphogenesis in situ as they retain their centriole-containing centrosome and some cell types (pillar cells) assemble large apico-basal arrays of several thousand

microtubules (Henderson et al., 1994; Mogensen et al., 1997; Tucker et al., 1992, 1995). In these cells,  $\gamma$ -tubulin and pericentrin are present at the centrosome, but the majority of the microtubules elongate from non-centrosomal apical sites (Mogensen et al., 1997). Genetic, biochemical and structural findings provide compelling evidence for  $\gamma$ -tubulin (as part of a complex) being the nucleator of microtubules (Horio et al., 1991; Joshi et al., 1992; Moritz et al., 1995, 1998; Moudjou et al., 1996; Oakley and Oakley, 1989; Shu and Joshi, 1995; Stearns et al., 1991; Stearns and Kirschner, 1994; Sunkel et al., 1995; Tassin and Bornens, 1999; Vogel et al., 1997; Zheng et al., 1995). Pericentrin has been shown also to play an important role in microtubule nucleation, probably indirectly by providing a lattice for the assembly and organisation of  $\gamma$ -tubulin complexes (DICTENBERG et al., 1998; DOXSEY et al., 1994; PUROHIT et al., 1999). The cochlear studies suggest that the  $\gamma$ -tubulin complexes do not play a major role in microtubule anchorage as they are absent from the apical sites. The existence of two centrosomal microtubule minus-end associated complexes, a  $\gamma$ -tubulin nucleating complex and an anchoring complex responsible for the anchorage of microtubule minus-ends released from the  $\gamma$ -tubulin complex, was therefore also proposed following analyses of the cochlear epithelial cells (Mogensen et al., 1997; Mogensen, 1999). The novel concept of two functionally distinct centrosomal complexes is further analysed in this investigation with respect to the centrosomal protein ninein.

Ninein is a coiled-coil protein which localises to the centrosome in most cells which display the classic radial microtubule array. It has a putative GTP binding site, four leucine zipper domains and a potential EF-hand-like domain and may oligomerise and exist in macromolecular complexes (BOUCKSON-CASTAING et al., 1996; and unpublished observations). Ninein has been shown recently to accumulate primarily on the mother centriole in several post-mitotic cells (Piel et al., 2000). In mouse fibroblast (L929) cells, both centrioles possess associated  $\gamma$ -tubulin, and nucleate similar numbers of microtubules in microtubule-repolymerisation experiments, but only the mother centriole is located at the focus of the radial microtubule array during G<sub>1</sub>. This suggests a role for ninein in stabilising rather than in nucleating microtubules.

In order to clarify this issue, we conducted immunofluorescence and immunoelectron microscopical analyses of centrosomal ninein in L929 cells during the cell cycle progression, using cells stably expressing a GFP-centrin fusion protein. Due to centrin's striking concentration in the distal lumen of each centriole and in the early pro-centriole buds, this protein represents a very precise marker of the centrosome in living cells and of the cell cycle progression (Piel et al., 2000). Furthermore, cochlear supporting cells were used to investigate whether ninein, like  $\gamma$ -tubulin and pericentrin, is restricted to the immediate vicinities of the centrioles or whether it is located at the non-centrosomal apical sites and thus possibly implicated in microtubule anchorage. Localisation of ninein in both L929 and cochlear supporting cells indicates that ninein is a microtubule minus-end associated protein which is not directly involved in microtubule nucleation, but is important for the stability, positioning and anchorage of microtubules.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies

Antibodies to ninein polypeptides Pep1 and Pep3 were generated in rabbits, affinity purified as described previously (BOUCKSON-CASTAING et al., 1996) and were used at dilutions of 1:250 and 1:1000, respectively. Monoclonal antibodies to  $\gamma$ -tubulin (Sigma) and  $\alpha$ -tubulin (Amersham) and a rabbit polyclonal antibody to  $\gamma$ -tubulin (Sigma) were used at dilutions 1:1000, 1:500 and 1:5000, respectively. YL1/2 (diluted 1:100) (Serotec) was also used to detect  $\alpha$ -tubulin.

Cy3, Cy2 and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) diluted 1:400 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexia 488 goat anti-rabbit and Alexia 594 goat anti-mouse (Molecular probes) diluted 1:1000 were used as secondary antibodies. Goat anti-rabbit IgG-conjugated 5 nm colloidal gold diluted 1:40 was obtained from British Biocell International.

Control experiments, which consisted of the omission of the primary antisera, produced no detectable labelling in cochlea cryostat sections or whole mounts of the organ of Corti.

### Immunolabelling of GFP-centrin expressing L929 cells

L929 cells were grown in DME medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum. Stable clones expressing the centrin/GFP fusion protein were isolated as described elsewhere (Piel et al., 2000). In order to facilitate the location of centrosomes for immunoelectron analysis, cytoplasts were prepared by cell enucleation as described previously (Piel et al., 2000). A combination of nocodazole (5  $\mu$ M) and cold (40 minutes on ice) was used when required to depolymerise the microtubules. This treatment depolymerises even the most stable microtubules in L929 cells which resist 1  $\mu$ M nocodazole, and these do not reassemble when the cells are subsequently incubated in warm media containing 5  $\mu$ M nocodazole.

For indirect immunofluorescence studies cells were rapidly extracted with 0.2% NP40 in BRB80 (80 mM KPIPES, pH 6.8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA) for 30 seconds, followed by fixation in a mixture of 2% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde in PBS for 3 minutes. After reducing free aldehydes with 0.1% NaBH<sub>4</sub> in PBS, the coverslips were incubated in primary antibodies followed by the appropriate secondary antibody coupled to either cyanine 3 (red channel, Jackson ImmunoResearch) or AMKA (blue channel, Jackson ImmunoResearch). The green channel was used to record the GFP signal.

After immunostaining, cells were imaged on a Leica DMRXA microscope. Image stacks (200-nm steps) were recorded using a piezoelectric objective positioning device and a MicroMax CCD camera (Princeton Instruments). With a  $\times 100$  1.4 NA objective the final magnification on the chip was 67 nm/pixel. All centrin and ninein images shown in L929 cells are maximal intensity projections, while microtubules are presented as self-luminous reconstructions.

### Immunoelectron microscopy

Coated coverslips were prepared by pretreating them with a solution containing 20  $\mu$ g/ml collagen type I from rat tail (Sigma) and 5  $\mu$ g/ml fibronectin from bovine plasma (Sigma) for 1 hour at 37°C. Cells attached to glass coverslips were incubated in 1.5  $\mu$ g/ml cytochalasin D (Sigma) for 30 minutes, centrifuged at 15000 *g* for 40 minutes, rinsed with fresh medium and left to recover for 4 hours, all at 37°C. The resulting cytoplasts were subsequently extracted with 0.2% v/v NP40 in BRB80 for 30 seconds and fixed in 2% w/v paraformaldehyde in PBS with 0.05% or 0.25% glutaraldehyde for 10 minutes. They were then quenched in PBS containing 0.1% NaBH<sub>4</sub> for 15 minutes, incubated with the anti-ninein Pep3 antibody diluted 1:100 for 1 hour, washed in PBS, incubated with 5 nm gold-conjugated secondary antibody for 1 hour and washed in PBS. The cytoplasts were then post fixed in 2.5% glutaraldehyde for 30 minutes followed by 1% osmium tetroxide for 30 minutes, both in 0.1 M sodium cacodylate buffer and processed for electron microscope

analysis as described previously (Henderson et al., 1994).

#### Immunolabelling of organ of Corti whole mounts and isolated cells

Mouse (Swiss CD1) cochlea day 0 to 5 were dissected as described previously (Mogensen et al., 1997). Organs were fixed in 90% v/v methanol and 10% v/v MES buffer (100 mM MES, 1 mM EGTA and 1 mM MgSO<sub>4</sub> at pH 6.9) (Sigma) at -20°C for 3 minutes, rehydrated in PBS containing 1% v/v goat serum (Sigma) for 2 minutes and processed as described previously (Mogensen et al., 1997). Alternatively, organ of Corti were transferred to slides and left to dry onto slides prior to immunolabelling. All organ explants were mounted in Citifluor (Agar Scientific). Co-labelling with the mouse monoclonal antibody to  $\gamma$ -tubulin and the rat monoclonal YL1/2 was carried out in a stepwise procedure.

Isolated pillar cells were obtained by aspirating organs of Corti suspended in the final wash of distilled water through a 200  $\mu$ l yellow tip. The cells were left to dry onto slides and mounted in Citifluor.

Fluorescent images were recorded with a Bio-Rad MRC 600 Series laser scanning/confocal imaging system operating in conjunction with a Nikon Microphot-SA microscope. For detailed analysis of the labelling, projections of serial optical sections collected at 0.2  $\mu$ m intervals were obtained. Digital image files were transferred to Photoshop for image handling and printed on an Epson 750 colour printer.

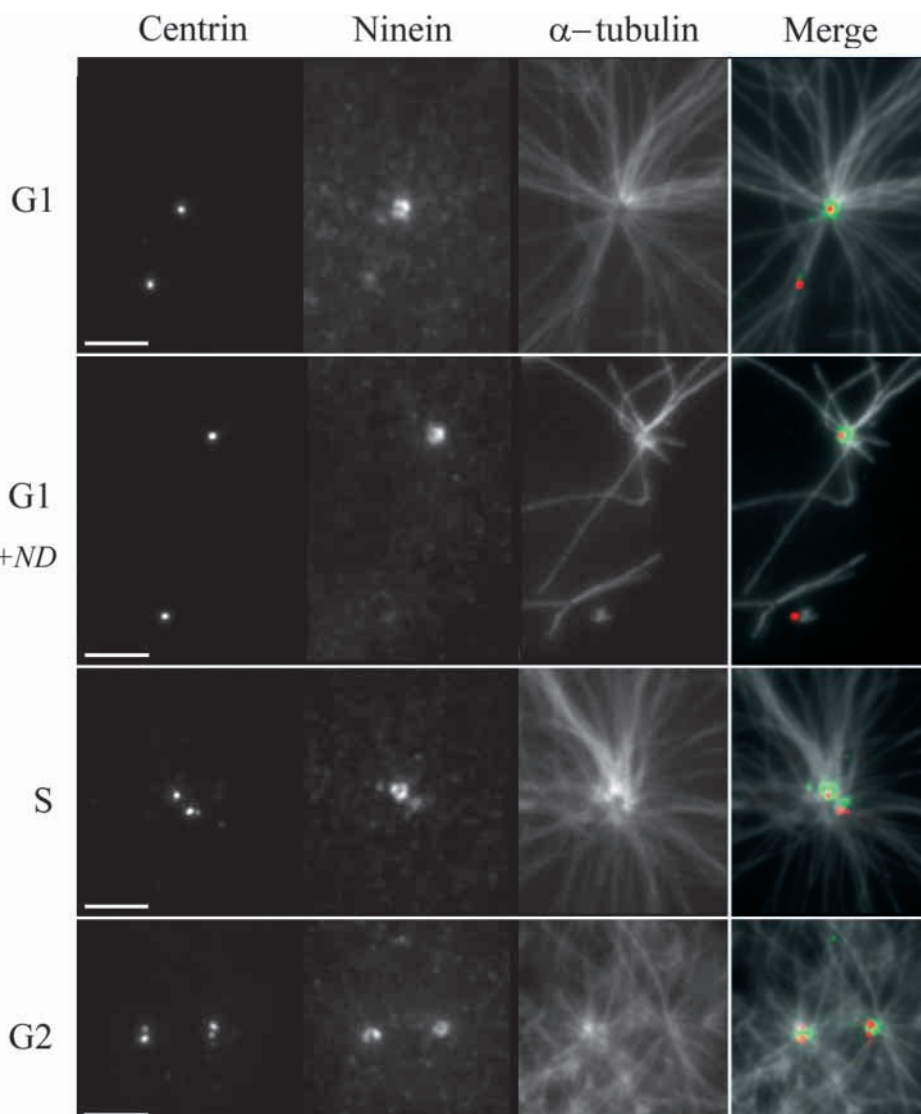
#### Nocodazole treatment of organ of Corti explants

Three day mice cochlea were dissected as above and organ of Corti explants were attached to collagen coated coverslips (Becton Dickinson). The organ of Corti explants were treated with 10  $\mu$ g/ml nocodazole diluted in culture medium from a stock solution of 10 mg/ml DMSO for 1 hour at room temperature followed by 3 hours on ice. They were subsequently fixed and incubated in the Pep3 anti-ninein and anti  $\alpha$ -tubulin antibodies and processed as above.

## RESULTS

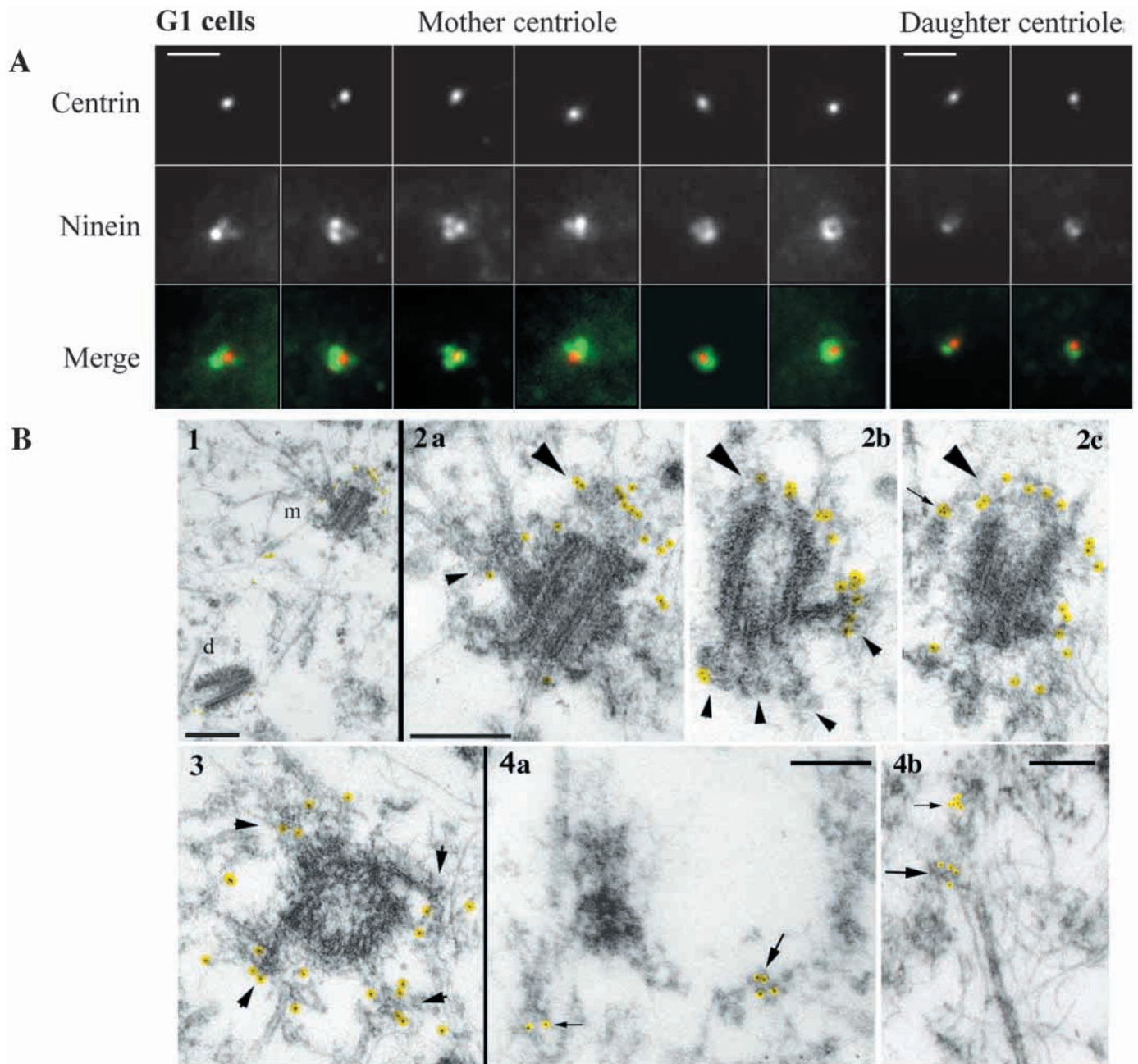
### Microtubule organisation and centrosomal ninein distribution in cells which support a radial microtubule array

Ninein localisation was analysed in L929 cells which exhibit a classic radial microtubule array and possess mother and daughter centrioles which are sufficiently separated during G<sub>1</sub> to enable distinction. Furthermore, centrin-GFP expressing

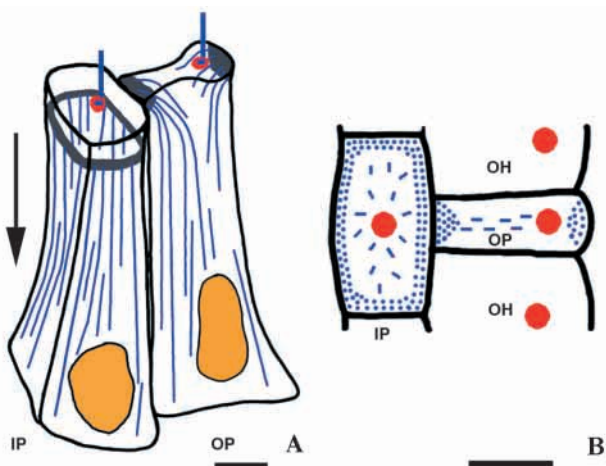


**Fig. 1.** Ninein associates with the mother centriole in G<sub>1</sub> cultured cells and with both diplosomes in G<sub>2</sub>. Synchronised L929 cells expressing GFP-centrin (red in merged image) which concentrates in the lumen of both centrioles, were fixed and labelled with anti-ninein (green in merged image) and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies. In G<sub>1</sub> cells, the mother and daughter centrioles can be distinguished by the presence of an aster of microtubules around the mother-centriole only. Ninein staining is conspicuous and organized in several dots, most often three, on the mother centriole whereas it is very weak on the daughter centriole. Note the converging bundles of microtubules abutting in the ninein dots. When G<sub>1</sub> cells are treated for 10 minutes with 1  $\mu$ M nocodazole (G<sub>1</sub>+ND), most of the stable microtubules remain anchored at the mother centriole. During S phase, the centrin-GFP labelling indicates the presence of a bud by a small dot closely associated with each parental centriole (only one is visible in S row, probably due to the orientation of the pro-centriole bud with respect to the parental centriole; but two are evident in G<sub>2</sub> row). An increase in the ninein signal associated with the daughter centriole can be observed. During G<sub>2</sub>, the distance between the two GFP-centrin dots in each diplosome has increased and an abundant ninein signal is now seen on both diplosomes. An aster of microtubules can be seen around each diplosome. Bars, 3  $\mu$ m.

L929 cells allowed us to perform double immunofluorescence localisation for ninein (using a Cy3-coupled secondary antibody) and microtubules (using an AMKA-coupled secondary antibody) with respect to the position of the individual centrioles observed in the GFP channel. The



**Fig. 2.** Ninein distribution within the centrosome of G<sub>1</sub> cells reveals association with the centriolar appendages and microtubule minus-ends. (A) Immunofluorescence staining of ninein on six mother centrioles (left) and two daughter centrioles (right) showing either, from left to right, one strong and two dim dots, two strong and one dim dots, three strong dots, or less defined dots associated with the mother centrioles whereas only a dim dot of ninein is apparent on the daughter centrioles. Bars, 2  $\mu$ m. (B) Ultrastructural immunogold localisation of ninein (gold particles are indicated by a transparent yellow dot) in 1: low magnification of a centrosome which shows how the mother (m) and the daughter (d) centrioles can be distinguished by the presence of appendages on the former, to which microtubules are associated; 2: sagittal (a), pseudo-sagittal (b) and oblique (c) sections through mother centrioles showing ninein associated with the tip of the centriolar appendages; 3: cross-section of a mother centriole with ninein concentrated on the centriolar appendages and 4: ninein labelling of microtubule minus-ends and small dense aggregates within the pericentriolar material. Bars, 0.3  $\mu$ m (1), 0.2  $\mu$ m (2,3) and 0.1  $\mu$ m (4). The electron microscope analysis in B suggests that the different patterns of immuno-fluorescent dots observed on the mother centrioles in A (left) reflect different organisations of the appendages at the tips of which gold particles accumulate (small arrowheads). A high concentration of ninein is also evident at the proximal-end and thus the minus-end of the mother centrioles (large arrowheads) and the daughter centrioles (not shown). The weakly stained dot of ninein observed in immuno-fluorescence on the daughter centrioles in A (right) probably corresponds to the presence of ninein at the proximal end of the centrioles. The electron microscope analyses also reveal gold particles at the end of microtubules in the vicinity of the centrioles (small arrows) and on small aggregates of dense material (large arrow) within the pericentriolar material.



**Fig. 3.** Schematic diagrams of the microtubule organisation (blue lines) in the inner pillar (IP) and outer pillar (OP) cells when the apico-basal arrays are assembling. Bars, 5  $\mu$ m.

(A) 3-D representation of the IP and OP cells showing apically located centrosomes (red, with centriole and primary cilium in blue) and the majority of the microtubules associated with an apical peripheral ring of dense material (grey) in the IP and two dense aggregates (grey) at either end of the apex in the OP. The nucleus (yellow) is located near the base of the cells. The arrow indicates the direction of microtubule elongation. (B) Apical view of the pillar cells showing the location of the centrosomes (red), microtubule ends (blue dots) at the apical sites and the transient microtubule population (blue lines). A peripheral ring of about 3000 microtubule ends, located about 1  $\mu$ m below the centrosome, is evident in the IP. The microtubule ends are concentrated at either end of the apex in the OP. Some 4000 microtubule ends are concentrated at the apical site which is located closest to the IP and up to 7  $\mu$ m away from the centrosome, while about 1500 are evident at the other site.

centrosomal distribution of ninein during cell cycle progression is shown in Fig. 1. Ninein is associated primarily, if not exclusively, with the mother centriole, which is at the centre of the aster of microtubules during  $G_1$  (Piel et al., 2000). Only the ninein-containing centriole maintains an aster of microtubules after treatment with low doses of Nocodazole, indicating that

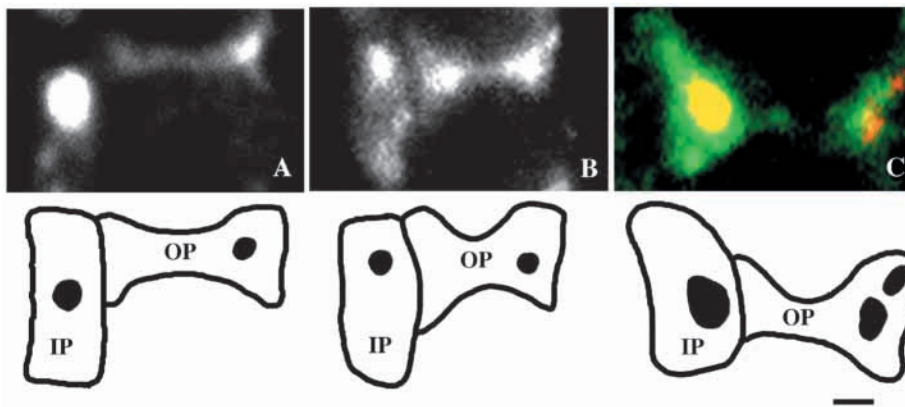
these are more stable (Fig. 1, second row). Progressive accumulation of ninein is evident on both diplosomes, together with the appearance of two asters of microtubules during S- $G_2$ .

The conspicuous ninein staining on the mother centriole is of particular note, as it is often organised into several dots, most often three, although variations to this pattern could be observed. Several examples are shown in Fig. 2A. We often noted also that the converging bundles of microtubules seemed to abut the ninein-containing dots (see Fig. 1). This suggests that they may correspond to the subdistal appendages which surround the mother centriole, at the tip of which microtubules are often seen to terminate at the EM level (De Brabander, 1982; Gorgidze and Vorobjev, 1995). The specific localisation of ninein within the centrosome of L929 cells was therefore investigated using immunoelectron microscopy of cytoplasts from  $G_1$  cells. We used a pre-embedding immunogold labelling procedure which enables clear identification of microtubules and centriolar sub-structures. Gold labelling is evident within the pericentriolar material as observed previously (Bouckson-Castaing et al., 1996), but distinct associations with microtubule-ends and the subdistal centriolar appendages are also evident. Specific labelling of the tips of the subdistal appendages, which support a fascicle of microtubules, is clearly evident (Fig. 2B). A relatively high concentration of gold particles is apparent within dense material associated with one of the centriolar ends. In sections where the proximal-end of the centriole, and thus the minus-ends of its microtubules, can be defined (due to the position of the subdistal and distal appendages) the gold labelling seems to preferentially associate with the minus-end. Microtubule-ends within the pericentriolar material are difficult to define, but a few microtubules show apparent end-on association with gold labelled dense material (Fig. 2B2c,4a,b). These labelled microtubule-ends are most likely to be the minus-ends as they are situated in relatively close proximity to a centriole.

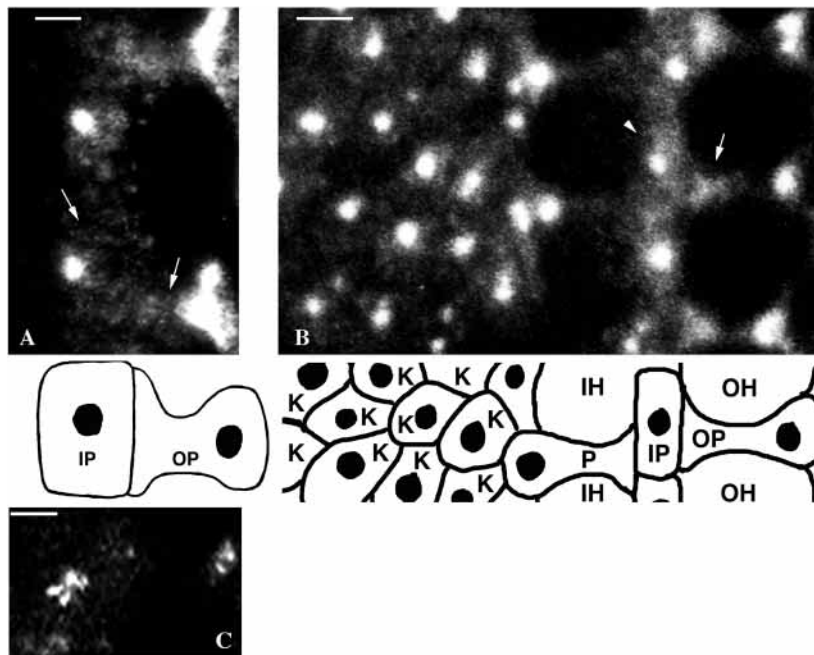
#### Microtubule organisation in cochlear supporting cells which display a non-radial array

The construction of large apico-basal microtubule arrays in the supporting inner and outer pillar cells of the organ of Corti involves microtubule nucleation at the centrosome, release,

**Fig. 4.** Projections of optical sections through the apices of inner (IP) and outer (OP) pillar cells labelled for  $\alpha$ -tubulin in A and B or double labelled for  $\alpha$  and  $\gamma$ -tubulin in C at different stages of assembly of the apico-basal microtubule arrays. Cell outlines together with the centrosome profiles are diagrammatically represented below. Bar, 2  $\mu$ m. (A) Tubulin labelling is mainly concentrated at the centrosome by early day 1, but there is evidence also of some diffuse labelling in the region between the centrosome and the apical sites in both pillar cells. (B) A concentration of tubulin labelling is apparent at the apical sites and at the centrosome by late day 2. The region between the centrosome and the apical sites, where the transient microtubule population has been reported previously, is now showing distinct staining. (C) Double staining for  $\alpha$ -tubulin (green) and  $\gamma$ -tubulin (red) reveals co-localisation (yellow/orange) at the centrosome in the inner and outer pillar cells. There is no evidence of binding of the antibody to  $\gamma$ -tubulin at the apical sites or in the region between the centrosome and the apical sites.



**Fig. 5.** Projections of optical sections through the apical regions of supporting cells labelled with an antibody to ninein. Cell outlines are diagrammatically represented below. (A) Apical view of ninein localisation at early day 1 in two inner (IP) and two outer (OP) pillar cells. Ninein is mainly concentrated at the centrosome and its immediate environ, but diffuse labelling is apparent also in the region between the centrosome and the apical sites in both pillar cells (arrows). Bar, 2.5  $\mu\text{m}$ . (B) Apical view of ninein distribution at late day 2 in the Kollikers' (K), inner phalangeal (P), inner hair (IH), inner pillar (IP), outer pillar (OP) and outer hair (OH) cells showing distinct presence in the supporting cells (K, P, IP and OP) while little or no ninein in the hair cells (IH and OH). The centrosomes label strongly in all the supporting cells but non-centrosomal labelling is evident also. The apical site where some 4000 microtubule minus-ends are accumulating in the outer pillar cells shows particularly high non-centrosomal concentration of ninein (arrow). The non-centrosomal ninein in the inner pillar cells is evident at the apical sites and in the region occupied by the transient microtubule population (arrowhead). Ninein is distributed diffusely throughout the non-centrosomal apical region in most of the Kollikers' cells. Bar, 5  $\mu\text{m}$ . (C) A single optical section through the apex of an IP and an OP cell at the level of the centrioles showing ninein staining organised into two or more dots at late day 0. Bar, 2  $\mu\text{m}$ .

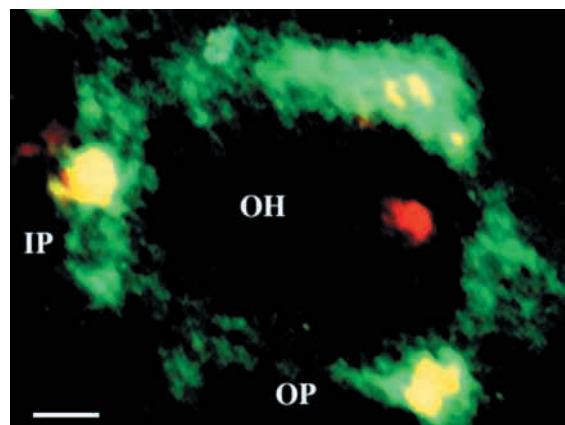


translocation and subsequent capture at apical non-centrosomal sites (Mogensen et al., 1997; Mogensen, 1999). Developing mouse cochlear epithelia cells provide an excellent system to study this proposal in detail.

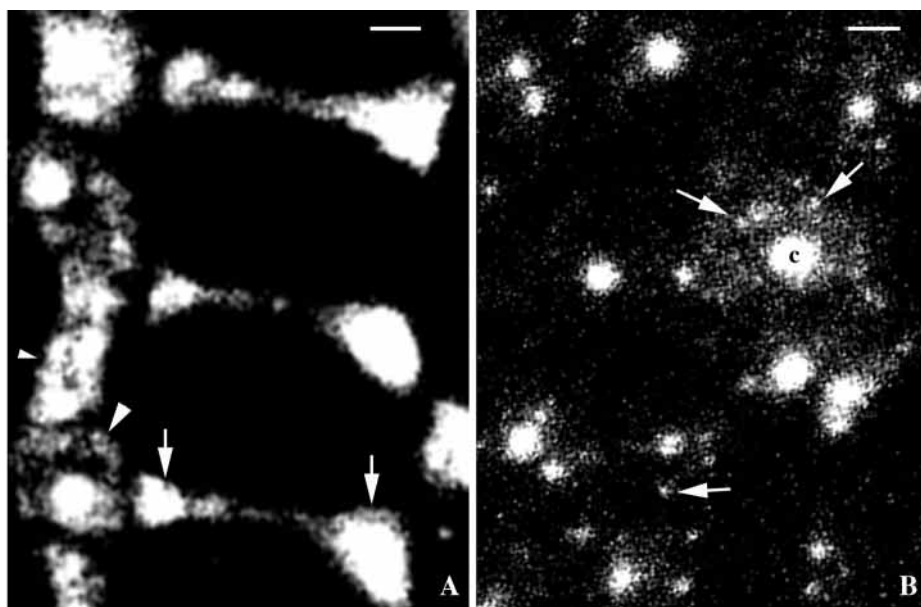
Assembly of these apico-basal arrays proceeds over the first 6 days after birth. Only a few microtubules radiate from the apical located centrosome while assembly of the apico-basal arrays is progressing. In the inner pillar cells some 3000 microtubules elongate from a peripheral ring of dense material, which results in the construction of a tube of microtubules (Fig. 3; see also Fig. 7 of Mogensen et al., 1997). In the outer pillar cells up to 4000 microtubules project from dense aggregates located on opposite sides of the apical cell surface and up to 7  $\mu\text{m}$  away from the centrosome (Fig. 3; see also Fig. 3 of Tucker et al., 1995). Evidence suggests that a population of microtubules in transit is present in the inner and the outer pillar cells between the centrosome and the apical sites while microtubule assembly is proceeding (Fig. 3B). Microtubule hook-decoration and immuno-localisation of an antibody to the microtubule plus-end associated protein adenomatous polyposis coli tumour suppressor (APC) (Nathke et al., 1996) reveal uniform polarity of the apico-basal arrays and microtubule minus-ends at the apex (data to be published elsewhere). This means that thousands of microtubule minus-ends are concentrated at the apical sites in the pillar cells. Detection of microtubule minus-end associated proteins would thus be expected.

The microtubule nucleating proteins  $\gamma$ -tubulin and pericentrin have previously been shown to be present at the centrosome while absent from the apical sites where the majority of the microtubules are associated (Mogensen et al., 1997). This suggests that microtubule nucleation is restricted to the centrosome. Here we confirm by double immuno-

labelling with antibodies to  $\alpha$ -tubulin and  $\gamma$ -tubulin that  $\gamma$ -tubulin is confined to the centrosome. Optical sections through the apex (to a depth of about 3  $\mu\text{m}$ ) of inner and outer pillar cells show a distinct concentration of  $\alpha$ -tubulin labelling in the centrosomal region at early day 1 (Fig. 4A). Only after day 1 does the  $\alpha$ -tubulin labelling become apparent at the apical sites in the inner pillar cell. Likewise, in the outer pillar cell, apical  $\alpha$ -tubulin staining is only apparent at about day 2. The intensity of staining at these sites increases with time suggesting that microtubules are gradually concentrating at the apical sites



**Fig. 6.** A projection of optical sections through the apex of an inner pillar (IP), outer hair (OH) and two outer pillar (OP) cells co-labelled with antibodies to  $\gamma$ -tubulin (red) and ninein (green) at day 3. Ninein co-localises with  $\gamma$ -tubulin (yellow) at the centrosome in the pillar cells but is apparently absent from the apical hair cell region. Ninein is also present at the apical sites and in the regions occupied by the transient microtubule population in the pillar cells. Bar, 2  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 7.** Projections of optical sections through the apical region of the pillar and Kollikers' cells at day 4 showing ninein localisation at the centrosome and at the apical sites. Bars, 2  $\mu$ m. (A) At this stage the transient population of microtubules has virtually gone and most of the microtubule minus-ends are concentrated at the apical sites in the pillar cells. A distinct peripheral ring (large arrowhead) of ninein is evident in some of the inner pillar cells while ninein is present throughout the apex in others (small arrowhead). Most of the ninein is concentrated at either side of the apex in the outer pillar cells (arrows), where most of the microtubule minus-ends are concentrated. The centrosome merges with the closest apical site (to the left). (B) In the Kollikers' cells, where microtubules project from multiple small sites scattered over the apical region, distinct small foci of ninein are evident in some (arrows). Ninein is also concentrated at the centrosome (c).

(Fig. 4B).  $\alpha$ -tubulin is also evident in the region between the centrosome and the apical sites, where the microtubule population in transit has been reported previously. The intensity of labelling in this region gradually increases until

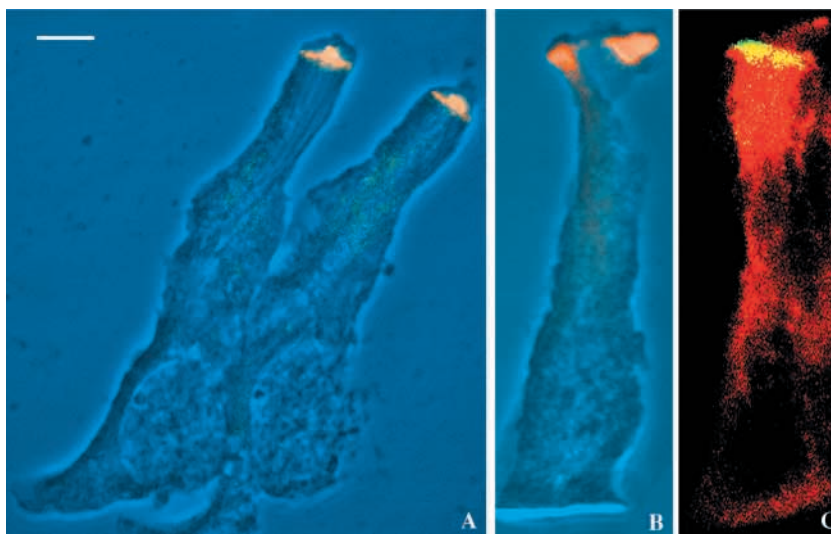
day 3 before decreasing and disappearing by day 4 to 5 (Fig. 4). There is no evidence of  $\gamma$ -tubulin in the region occupied by the microtubule population located between the centrosome and the apical sites or at the apical non-centrosomal sites in the pillar cells (Fig. 4C).

**Presence of ninein in centrosomal as well as apical non-centrosomal regions in the supporting cells**

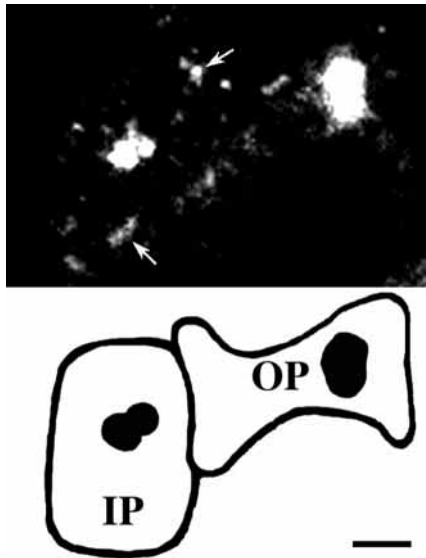
Analyses of the apical binding of the anti-ninein antibodies to whole mounts of organ of Corti reveal distinct labelling patterns in the supporting cells which are cell type specific and dependent on the stage of development. The location of the supporting cells can be identified by analysing the apical surface of the organ of Corti (see Mogensen et al., 1997; see also diagram in Fig. 5). Two anti-ninein antibodies raised against Pep1 and Pep3 to non-overlapping regions of ninein were used. They both reveal identical results, labelling the centrosome strongly in the supporting cells while only very weakly or not at all in the sensory hair cells (Fig. 5). Single optical sections through the centrioles of the pillar cells reveal that ninein is organised

into two or more dots similar to those observed for the cultured cells (Fig. 5C). However, projections of several optical sections through the apical region reveal that ninein labelling is not confined to the centrosome in the supporting cells, but is

**Fig. 8.** Isolated inner and outer pillar cells from organ of Corti at day 4, when the transient microtubule population has diminished, showing localisation of ninein in A and B and ninein and tubulin in C. Phase contrast (blue) images have been superimposed on the fluorescent images in A and B. Bar, 5  $\mu$ m. (A) A projection of optical sections through the lateral length of two inner pillar cells showing ninein (orange) concentrated in an apical band corresponding to the apical sites where up to 3000 microtubule minus-ends are located. A single dot of ninein is evident above the band at the location of the centrosome. Ninein is present at a relatively low level in the cytoplasm in the apical half of the cells. (B) A projection of optical sections through the lateral length of an outer pillar cell showing ninein (orange) accumulation at either end of the apex at the location of the apical sites where up to 4000 microtubule minus-ends are concentrated. Ninein labelling of the centrosome merges with that of the closest site (to the left). Cytoplasmic ninein is apparent in the apical half of the cell. (C) Co-labelling with antibodies to ninein (green) and  $\alpha$ -tubulin (red) reveals co-localisation (yellow) at the minus-end of the microtubule array in an inner pillar cell. A primary cilium projects at the top.







**Fig. 9.** A projection of optical sections through the apices of an inner and an outer pillar cell at day 3 treated with nocodazole showing a marked reduction in ninein at the apical sites and in the region normally occupied by the transit microtubule population. A high concentration of ninein is evident at the centrosomes while a few aggregates are apparent at the apical sites (arrows). A diagrammatic outline of the inner (IP) and outer (OP) pillar cells is shown below. Bar, 2  $\mu$ m.

evident also in the apical non-centrosomal region during days 1 to 3 after birth. The non-centrosomal labelling gradually increases in extent and intensity during this period. Ninein is mainly concentrated at the centrosome and its immediate environ in all three supporting cells at early day 1 (Fig. 5A), whereas it is evident throughout the apical region by day 2 (Fig. 5B). The non-centrosomal ninein labelling is particularly prominent at the apical sites where some 4000 microtubule minus-ends are accumulating in the outer pillar cells by day 2, while labelling is evenly distributed throughout the non-centrosomal apical region in the inner pillar cells (Fig. 5B). Both the inner and the outer pillar cells show relatively strong non-centrosomal ninein labelling throughout the apical region by day 3 (Fig. 6). In another cochlear supporting cell type, the Kollikers' cells, diffuse labelling is evident throughout the apical non-centrosomal region during days 2 to 3 (Fig. 5B). These cells resemble typical simple epithelial cells and have microtubules projecting from multiple foci located throughout the apical surface (see Mogensen et al., 1997).

The region between the centrosome and the apical sites, where the transient population of microtubules occurs, labels also with the ninein antibodies. The intensity of the labelling of this region gradually increases and is greatest at about day 3 when the transient population is most prominent (Fig. 6). Analyses of optical sections through the apex of organ of Corti at day 3 double labelled with anti-ninein and anti- $\gamma$ -tubulin antibodies reveal co-localisation at the centrosome, but the presence of ninein only in the apical non-centrosomal regions (Fig. 6). Double labelling of organ of Corti whole mounts with anti-ninein and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies reveals co-localisation at the centrosome, the apical sites and at the location of the transit microtubule population (results not

shown). This suggests that ninein is present at the centrosome and at the apical sites where most of the microtubule minus-ends accumulate. It also suggests that ninein is associated with the transient microtubule population during the assembly of the apico-basal arrays in the supporting cells.

#### Presence of ninein in the apical non-centrosomal sites

The localisation of anti-ninein antibodies was analysed in whole mounts of organ of Corti at days 4 and 5 when the transit microtubule populations have gone and several thousand microtubule minus-ends are concentrated at the apical sites. Optical sections through the apex reveal a distinct peripheral ring in some inner pillar cells while in others the entire apex stains with the antibodies to ninein (Fig. 7A). Not all cells assemble perfect tubular microtubule arrays or develop at the same rate, thus ring-like labelling would not be expected in all cells. Two strongly stained distinct foci are evident at either end of the apex in the outer pillar cells (Fig. 7A). The ninein antibodies also bind to the centrosome with a single dot being evident within the lumen of the peripheral ring in the inner pillar cell in optical projections. The centrosomal labelling in the outer pillar cell merges with that of the closest (by 1-2  $\mu$ m) apical site, thus only two definable regions of staining can be identified (Fig. 7A). In the Kollikers' cells centrosomal and non-centrosomal ninein labelling is evident as at the earlier stage, but some cell apices reveal distinct small aggregates of staining scattered throughout the apical surface (Fig. 7B).

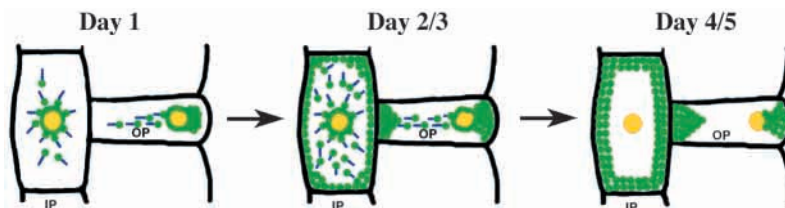
Ninein distribution was further analysed during this 'post-transit' microtubule stage in isolated inner and outer pillar cells at days 4 and 5. Projections of optical sections through the lateral length of the inner pillar cells reveal labelling of a single apical band 1-2  $\mu$ m below the apex with a foci above it (Fig. 8A). Two large foci located at either end of the apex label strongly with the ninein antibodies in the outer pillar cells (Fig. 8B). Evidence of weak cytoplasmic labelling in the apical halves of both inner and outer pillar cells is apparent at this stage. The ninein labelling in the pillar cells suggests that it corresponds to the location of the centrosomes and the peripheral ring in the inner pillar cells and the dense aggregates in the outer pillar cells, where several thousand microtubule minus-ends are concentrated. This was confirmed by double labelling with antibodies to ninein and  $\alpha$ -tubulin which reveals co-localisation of the ninein and  $\alpha$ -tubulin antibodies at the apical minus-end of the apico-basal microtubule arrays (Fig. 8C).

#### Effect of nocodazole on ninein which co-localises with the microtubule population in transit

The anti-ninein staining patterns vary with the stage of development and closely mimic the distribution of microtubules during this period when assembly is proceeding (see Figs 4, 5, 6, 7).

This suggests that ninein is released from the centrosome and translocates to the apical sites together with the microtubules and that ninein may be associated with the microtubules. If ninein is associated with the microtubules in transit then their depolymerisation should disrupt the distribution of ninein in this region. This was investigated by treatment with the microtubule depolymerising drug nocodazole.

**Fig. 10.** A diagrammatic representation of the distribution of ninein during assembly of the apico-basal microtubule arrays in the inner (IP) and outer (OP) pillar cells. It is proposed that ninein is released from the centrosome and translocates with the microtubules to the apical sites, where ninein is captured, and anchors the minus-ends of the microtubules. Ninein (green dots) is mainly concentrated at the centrosome at day 1 when microtubule assembly has been initiated and most of



the microtubules (blue lines) are concentrated in the centrosomal region. A few microtubules with associated ninein occupy the “transit” region. Ninein gradually increases and is prominent at the apical sites and in the region occupied by the microtubule population in transit at day 2/3. Subsequently, ninein becomes concentrated at the centrosome and at the apical sites as the microtubule population in transit diminishes at day 4/5. In the inner pillar cell a distinct peripheral ring of ninein is evident where some 3000 microtubule minus-ends are concentrated. In the outer pillar cells ninein aggregates at either end of the apex where, respectively, 4000 and 1500 microtubule minus-ends are concentrated.

Exposure to nocodazole at day 3 causes depolymerisation of most of the microtubules in the apical region in most of the pillar cells with a few stable microtubules remaining (result not shown). Nocodazole treatment does not appear to affect ninein’s association with the centrosome in the pillar or Kollikers’ cells but its localisation in the region of the transit population is lost. Furthermore, a punctate peripheral ring of ninein is evident in the inner pillar cells and a few foci are apparent at the distal apical site in the outer pillar cells (Fig. 9). This suggests that ninein is dependent on the microtubules for its localisation in the “transit” region while it may be stably bound to the centrosome and the apical sites.

## DISCUSSION

### Microtubule nucleation and anchorage

The centrosome is responsible not only for the nucleation of microtubules, but also for their anchorage. Although substantial evidence points to the  $\gamma$ -tubulin complex as the nucleator of microtubules, it remains to be established whether it also plays a major role in microtubule anchorage. Previous evidence from studies on cochlear supporting cells suggests that other centrosomal complexes may be responsible for microtubule anchorage (Mogensen et al., 1997; Mogensen, 1999). Two functionally distinct microtubule minus-end associated complexes, a nucleating and an anchoring, have been suggested to be fundamental components of the centrosome. This is supported also by recent findings in L929 cells which reveal that the mother and daughter centrioles make distinct contributions to centrosomal activity and behaviour which may be related to their differences in microtubule anchoring and release (Piel et al., 2000). This novel concept of a centrosomal anchoring complex, distinct from the  $\gamma$ -tubulin nucleating complex, has important implications for microtubule organisation in cells generally. Evidence from two different cell systems presented in this investigation suggests that the centrosomal protein ninein is involved in microtubule minus-end anchorage and stability and that it is a candidate for the proposed anchoring complex.

### Ninein and microtubule minus-ends

Ninein, which localises to the centrosome in most cells, has been shown recently to accumulate primarily on the mother centriole which is located at the focus of the radial microtubule

array during G<sub>1</sub> (Piel et al., 2000). This, together with the higher stability of the mother centriole-associated microtubules, suggests a stabilising mechanism of the aster of microtubules on the mother centriole, distinct from the nucleating activity of the centrosome. Ninein would be an obvious candidate for participating in the stabilisation of the aster.

Immuno-localisation of ninein during the progression of the cell cycle reported here, as well as immunoelectron microscopical analyses of ninein localisation within the centrosome of L929 cells, provide further evidence for microtubule minus-end association and its role in anchorage. Specific localisation of ninein at the tips of the subdistal centriolar appendages provides strong evidence for a role in anchorage (Moudjou et al., 1996; Paintrand et al., 1992) and minus-end association as a fascicle of microtubules projects from these appendages. Microtubule ends within the pericentriolar material also reveal ninein association and those in close proximity of a centriole, which enables prediction of polarity, suggest minus-end affinity. Interestingly, the centriole shows strong ninein association with its minus-end. The proximal end of a centriole which contains the minus-ends of its wall microtubules would be expected to sequester and anchor any minus-end binding proteins (Tassin and Bornens, 1999). Ninein association with the minus-end of the centrioles is therefore significant and indicative of a microtubule minus-end binding protein.

In the cochlear supporting cells ninein is not confined to the centrosome. Ninein is present also at the apical sites where the majority of the microtubule minus-ends are concentrated. The distribution of ninein is dependent on the microtubules and varies with their organisation, producing distinct patterns within the apex in the Kollikers’ and pillar cells at different stages of microtubule assembly. Ninein co-localises with  $\gamma$ -tubulin at the centrosome and gradually accumulates at the apical non-centrosomal sites as microtubule assembly progresses. This accumulation coincides with the gradual increase in microtubules at the apical sites. In the inner pillar cells ninein is evident at the end of the tubular array of microtubules localised to the apical peripheral ring where about 3000 microtubule minus-ends are associated. Ninein is present at the end of the two microtubule arrays at either side of the apex in the outer pillar cell where some 4000 and 1500 microtubule minus-ends are concentrated respectively. Multiple focal points of ninein become evident in the

Kollikers' cells once the apico-basal microtubule arrays are established. The distinct localisation of ninein within these three supporting epithelial cells strongly suggests that ninein associates with the minus-end of microtubules.

### Ninein and microtubule translocation and anchorage

Evidence from the cochlear supporting cells suggests that  $\gamma$ -tubulin is concentrated at the centrosome. It is apparently not released with the microtubules as it is absent from the population of microtubules in transit. Similarly,  $\gamma$ -tubulin is confined to a single apical focal point in other polarised epithelial cells such as MDCK and those of the retinal pigment epithelium (Meads and Schroer, 1995; Rizzolo and Joshi, 1993). Evidence from neurons also indicates that  $\gamma$ -tubulin may not remain associated with the minus-end of microtubules once released from the centrosome (Baas and Joshi, 1992). In the cochlea ninein, on the other hand, co-localises with the population of microtubules in transit and shows a distinct and dramatic change in its distribution from the centrosome to the apical sites as assembly progresses. This suggests that ninein is released from the centrosome. The progressive shift in ninein localisation mimics that of tubulin, suggesting that ninein is released from the centrosome with the microtubules. Furthermore, it also suggests that ninein translocates to the apical sites with the microtubules (Fig. 10). In agreement with this view, nocodazole-induced microtubule depolymerisation in the pillar cells results in a marked reduction in the non-centrosomal ninein whereas there is no apparent change in the centrosomal localisation. The most marked change in the ninein distribution is in the region normally occupied by the microtubule populations in transit suggesting that ninein is dependent on the microtubules and that it associates with microtubules. The reduced ninein association at the apical sites indicates that not all ninein is firmly attached at this stage and is therefore lost or redistributed when the microtubules depolymerise. Nocodazole treatment did not prove effective beyond day 3 and the predicted increase in anchored ninein at the apical sites at later stages of microtubule assembly could not be verified.

Centrosomal microtubule nucleation and release is not a new concept and has convincingly been shown to be the main mechanism for producing non-centrosomal, free microtubules in the axons and dendrites of neurons and has recently been visualised in epithelial culture cells (Baas, 1998; Keating et al., 1997). However, in polarised epithelial cells, unlike in neurons, microtubules are proposed to be captured at the apical sites following their release. Microtubule minus-end capping, stabilisation and anchorage is evidently an important part of this mechanism. The present findings provide further support for centrosomal microtubule nucleation, release and subsequent translocation and capture at the apical non-centrosomal sites and suggest that ninein provide the essential stabilising and anchoring factor.

### Ninein, a non-nucleating microtubule minus-end stabilising and anchoring protein

Ninein is evidently a strong contender for the postulated centrosomal anchoring complex (Mogensen et al., 1997). Ninein's association with the microtubules in transit suggests that it may perform an additional role in capping and stabilising the minus-end of centrosomally released microtubules. This is

supported by recent findings from studies on L929 cells which show that ninein preferentially associates with the mother centriole. This is significant as only the mother centriole is able to maintain a radial microtubule array although both centrioles contain  $\gamma$ -tubulin and assemble similar numbers of microtubules in microtubule-repolymerising experiments (Piel et al., 2000). Furthermore, ninein's specific localisation to the tips of centriolar appendages and the minus-ends of microtubules and centrioles within the centrosome, as shown in this investigation, provides further support for its role in microtubule minus-end anchorage.

Whether ninein is directly interacting with microtubules or forms a complex with other anchoring proteins is currently not known. Interestingly, the centrosomal protein R2 (Blomberg-Wirschell et al., 1998) which, like ninein, associates with the tips of centriolar appendages is a potential microtubule anchoring protein. Evidence is clearly emerging which strongly suggests that the centrosome contains separate microtubule nucleating and anchoring complexes.

We thank the Wellcome Trust for support (grant 049616/Z/96/Z/WRE/MK/JAT) and M.B. acknowledges CNRS, Institut Curie, DRET and ARC. We also thank Birgit Lane for continuous encouragement and use of her lab. and research facilities and John Tucker for use of his lab. for the initial testing of ninein. We thank also Roy Quinlan, Alan Prescott and Rebecca Porter for stimulating discussions and helpful comments.

## REFERENCES

- Achler, C., Filmer, D., Merte, C. and Drenckhahn, D. (1989). Role of microtubules in polarized delivery of apical membrane proteins to the brush border of the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* **109**, 179-189.
- Baas, P. W. and Joshi, H. C. (1992).  $\gamma$ -Tubulin distribution in the neuron: Implications for the origin of neuritic microtubules. *J. Cell Biol.* **119**, 171-178.
- Baas, P. W. (1998). The role of motor proteins in establishing the microtubule arrays of axons and dendrites. *J. Chem. Neuroanat.* **14**, 175-180.
- Berns, M. W. and Richardson, S. M. (1977). Continuation of mitosis after selective laser microbeam destruction of the centriolar region. *J. Cell Biol.* **75**, 977-982.
- Blomberg-Wirschell, M., Young, A., Zimmerman, W. and Doxsey, S. J. (1998). A novel centrosome protein localised to the subdistal appendages of the maternal centriole: possible role in microtubule binding at the centrosome. *Mol. Biol. Cell* **9**, 9a,45 abs.
- Bornens, M. and Karsenti, E. (1984). The centrosome. In *Membrane structure and function* (ed. E. E. Bittar), pp. 99-172. New York: John Wiley and Sons.
- Bornens, M. (1992). Structure and function of isolated centrosomes. In *The centrosome* (ed. V. I. Kalnins), pp. 1-43. San Diego: Academic Press.
- Bouckson-Castaing, V., Moudjou, M., Ferguson, D. J. P., Mucklow, Y. B. and Milton, G. C., P. R. (1996). Molecular characterisation of ninein, a new coiled-coil protein of the centrosome. *J. Cell Sci.* **109**, 179-190.
- Bré, M.-H., Kreis, T. E. and Karsenti, E. (1987). Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby kidney cells: The occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J. Cell Biol.* **105**, 1283-1296.
- Bré, M.-H., Pepperkok, R., Hill, A. M., Levilliers, N., Ansoorge, W., Stelzer, E. H. K. and Karsenti, E. (1990). Regulation of microtubule dynamics and nucleation during polarization in MDCK II cells. *J. Cell Biol.* **111**, 3013-3021.
- Brinkley, B. R. (1985). Microtubule organizing centres. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 145-172.
- De Brabander, M. (1982). A model for the microtubule organising activity of the centrosomes and kinetochores in mammalian cells. *Biol. Int. Reports* **6**.
- Dictenberg, J. B., Zimmerman, W., Sparks, C. A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F. S. and Doxsey, J. (1998). Pericentri-

- and  $\gamma$ -tubulin form a protein complex and are organised into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* **141**, 163-174.
- Doxsey, S. J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P. D. and Kirschner, M.** (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* **76**, 639-650.
- Gilbert, T., Le Bivic, A., Quaroni, A. and Rodriguez-Boulan, E.** (1991). Microtubular organization and its involvement in the biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **113**, 275-288.
- Gorgidze, L. A. and Vorobjev, I. A.** (1995). Centrosome and microtubule behavior in the cytoplasts. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **27**, 381-389.
- Gould, R. R. and Borisy, G. G.** (1977). The pericentriolar material in Chinese hamster cells nucleates microtubule formation. *J. Cell Biol.* **73**, 601-615.
- Henderson, C. G., Tucker, J. B., Chaplin, M. A., Mackie, J. B., Maidment, S. N., Mogensen, M. M. and Paton, C. C.** (1994). Reorganisation of the centrosome and associated microtubules during the morphogenesis of a mouse cochlear epithelial cell. *J. Cell Sci.* **107**, 589-600.
- Horio, T., Uzawa, S., Jung, M. K., Oakley, B. R., Tanaka, K. and Yanagida, M.** (1991). The fission yeast  $\gamma$ -tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J. Cell Sci.* **99**, 693-700.
- Ihrke, G., Neufeld, E. B., Meads, T., Shanks, M. R., Cassio, D., Laurent, M., Schroer, T. A., Pagano, R. E. and Hubbard, A. L.** (1993). WIF-B cells: An in vitro model for studies of hepatocyte polarity. *J. Cell Biol.* **123**, 1761-1775.
- Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L. and Cleveland, D. W.** (1992).  $\gamma$ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* **356**, 80-83.
- Keating, T. J., Peloquin, J. G., Rodionov, V. I., Momcilovic, D. and Borisy, G. G.** (1997). Microtubule release from the centrosome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**, 5078-5083.
- Kellogg, D. R., Moritz, M. and Alberts, B. M.** (1994). The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 639-674.
- McIntosh, J. R. and Euteneuer, U.** (1984). Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **98**, 525-533.
- Meads, T. and Schroer, T. A.** (1995). Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskel.* **32**, 273-288.
- Mogensen, M. M., Mackie, J. B., Doxsey, S. J., Stearns, T. and Tucker, J. B.** (1997). Centrosomal deployment of  $\gamma$ -tubulin and pericentrin: Evidence for a microtubule-nucleating domain and a minus-end docking domain in certain mouse epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskel.* **36**, 276-290.
- Mogensen, M. M.** (1999). Microtubule release and capture in epithelial cells. *Biol. Cell* **91**, 331-341.
- Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Albert, B. and Agard, D. A.** (1995). Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* **378**, 638-640.
- Moritz, M., Zheng, Y., Alberts, B. M. and Oegema, K.** (1998). Recruitment of the  $\gamma$ -tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds. *J. Cell Biol.* **142**, 775-786.
- Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M. and Bornens, M.** (1996).  $\gamma$ -Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J. Cell Sci.* **109**, 875-887.
- Nathke, I. S., Adams, C. L., Polakis, P., Sellin, J. H. and Nelson, W. J.** (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J. Cell Biol.* **134**, 165-179.
- Oakley, C. E. and Oakley, B. R.** (1989). Identification of  $\gamma$ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662-664.
- Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H. and Bornens, M.** (1992). Centrosome organisation and centriole architecture: Their sensitivity to divalent cations. *J. Struct. Biol.* **108**, 107-128.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C. L. and Bornens, M.** (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* **149**, 317-329.
- Purohit, A., Tynan, S. A., Vallee, R. and Doxsey, S. J.** (1999). Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organisation. *J. Cell Biol.* **147**, 481-491.
- Rizzolo, L. J. and Joshi, H. C.** (1993). Apical orientation of the microtubule organizing center and associated  $\gamma$ -tubulin during the polarization of the retinal pigment epithelium in vivo. *Dev. Biol.* **157**, 147-156.
- Shu, H. B. and Joshi, H. C.** (1995).  $\gamma$ -Tubulin can both nucleate microtubule assembly and self-assemble into novel tubular structures in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **130**, 1137-1147.
- Stearns, T., Evans, L. and Kirschner, M.** (1991).  $\gamma$ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* **65**, 825-836.
- Stearns, T. and Kirschner, M.** (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of  $\gamma$ -tubulin. *Cell* **76**, 623-637.
- Sunkel, C. E., Gomes, R., Sampaio, P., Perdigo, J. and Gonzalez, C.** (1995).  $\gamma$ -Tubulin is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in *Drosophila* neuroblasts. *EMBO J.* **14**, 28-36.
- Tassin, A.-M. and Bornens, M.** (1999). Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol. Cell* **91**, 343-354.
- Trout, L. L. and Burnside, B.** (1988). The unusual microtubule polarity in teleost retinal pigment epithelial cells. *J. Cell Biol.* **107**, 1461-1464.
- Tucker, J. B., Paton, C. C., Richardson, G. P., Mogensen, M. M. and Russell, I. J.** (1992). A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea. *J. Cell Sci.* **102**, 215-226.
- Tucker, J. B., Mogensen, M. M., Paton, C. C., Mackie, J. B., Henderson, C. G. and Leckie, L. M.** (1995). Formation of two microtubule-nucleating sites which perform differently during centrosomal reorganization in a mouse cochlear epithelial cell. *J. Cell Sci.* **108**, 1333-1345.
- Vogel, J. M., Stearns, T., Rieder, C. L. and Palazzo, R. E.** (1997). Centrosomes isolated from *Spisula solidissima* oocytes contain rings and an unusual stoichiometric ratio of  $\alpha/\beta$  tubulin. *J. Cell Biol.* **137**, 193-202.
- Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. and Mitchison, T.** (1995). Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex. *Nature*. **378**, 578-583.



# **ANNEXE II : UN SYSTEME IN VITRO POUR L'ETUDE DU CYCLE DE DUPLICATION DU CENTROSOME**

## **1. Résumé**

## **2. Papier IV : Centrosome Reproduction *in vitro* : Mammalian Centrosomes in *Xenopus* Lysates.**

Reproduction du centrosome *in vitro* : de centrosomes de mammifères dans des extraits d'ovocytes de xénope

# Centrosome Reproduction *in Vitro*: Mammalian Centrosomes in *Xenopus* Lysates

**Mathieu Piel and Michel Bornens**

Institut Curie, Section de Recherche  
75248 Paris Cedex 05, France

---

- I. Introduction
  - II. Logic of the Assay
  - III. Duplication Assay
    - A. Preparation of Centrosomes
    - B. Duplication Assay
    - C. Spindle Assay
  - IV. Major Pitfalls
  - V. Discussion
    - A. General Comments
    - B. The Starting Centrosomes
    - C. Duplication of Centrosomes
    - D. Evolution of the Microtubule Array
    - E. Assembly of Mitotic Spindle-like Structures without Chromosomes
  - VI. Prospects
    - A. Monitoring the Assay by Video or Electron Microscopy
    - B. Stepwise Centrosome Duplication
    - C. Spindle Assays
- References

---

## I. Introduction

Molecular characterization of centrosome components is progressing and significant advance could be expected in the coming years (see Bornens, 1999). Recent results indicate, for example, that the major aspects of centrosome-mediated microtubule



nucleation may soon be better understood at the molecular level. In contrast, centrosome reproduction, which is an important aspect of animal cell division, remains almost as unintelligible as it was at the time of Boveri, when the centrosome was seen as the "division organ," capable of coordinating cytoplasmic and nuclear division (see Wilson, 1925). A striking feature of centrosome reproduction is that it generally involves structural continuity, appearing as a duplication process: one needs a centrosome to assemble a new centrosome. This has long been a matter of speculation: the possibility that centrosome reproduction could rest on an extranuclear nucleic acid-based mechanism has long been proposed (see Johnson and Rosenbaum, 1991; Mignot *et al.*, 1993). A structural study of the yeast spindle pole body (SPB) (Bullit *et al.*, 1997) has suggested another possibility, also evoked in the past by some authors in the absence of experimental arguments, namely that controlled protein crystallization could be a critical step in the SPB duplication process.

A major obstacle for studying centrosome reproduction is that the centrosome is a single-copy organelle, which duplicates only once per cell division cycle. A direct study of the molecular mechanisms essential for centrosome duplication in animal cells is thus a difficult task. A genetic approach in model organisms such as the fly *Drosophila* or the worm *Caenorhabditis* should provide important information in the near future. Similar to other cellular pathways, the most rapid progress in identifying genes involved in the centrosome duplication pathway has come from unicellular organisms, particularly the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (for a review, see Adams and Kilmartin, 2000). Although the yeast centrosome, or SPB, is structurally quite different from the animal centrosome, one may assume that the centrosome duplication pathway is important enough for cell survival that it may have been conserved throughout the evolution of eukaryotic cells. One can therefore speculate that essential genes involved in this pathway are conserved and that general principles of centrosome inheritance will eventually come from comparing features observed in widely divergent systems. As a matter of fact, several genes have been identified in animal systems on the basis of their sequence similarity with yeast genes involved in the SPB duplication pathway (Middendorp *et al.*, 1997, 2000), as well as in microtubule nucleation (see Schiebel, 2000).

The structural complexity of the animal centrosome, particularly the presence of the centriole pair as a conspicuous feature, suggests that a specific study of the animal centrosome is needed. An alternative approach to decipher the centrosome duplication pathway has been to use marine or amphibian eggs in which early development occurs without cell growth by segmentation following each doubling of chromosomes and of the sperm-inherited centrosome. In these systems, centrosomes duplicate rapidly, in pace with the rapid embryonic cell division cycles. Moreover, centrosome assembly can be induced in specific ways depending on the organism used. In marine eggs, centrosome assembly from maternal stores can be triggered prematurely by various treatments that induce parthenogenetic activation (Kuriyama and Borisy, 1983). Frog eggs, however are unable to assemble a centrosome from its elements in the absence of preexisting centrosome, making this system favorable to study the initiation of centrosome duplication (for a review, see Paoletti and Bornens, 1997; Chapter 14). However, it is not easy to manipulate the eggs in order to interfere with centrosome duplication, and centrosome duplication itself is not monitored easily in such huge cells. Animal caps in which the

size of blastomeres is more compatible with the monitoring of centrosome duplication have proven to be a useful alternative (Gard *et al.*, 1990). A constant objective has been to derive a cell-free assay from these eggs in order to be able to easily modify the conditions in which centrosomes duplicate. Several attempts have been reported in the past. *Xenopus* egg extracts in which demembrated sperm heads are used to follow mitotic spindle assembly would appear as the most obvious system to follow sperm centrosome duplication (Sawin and Mitchison, 1991). However, direct and convincing demonstration of sperm centrosome duplication in these conditions has been lacking until recently for several reasons: first, it is difficult to resolve orthogonally associated centrioles by immunolabeling at the optical level, and thus to score a sufficient number of events in a reliable fashion. Ultrastructural analysis is feasible but is too tedious an approach to be used as a monitoring method. Moreover, spindles without asters at the poles are frequent in such an assay due to the fact that asters have dissociated either during the incubation of sperm heads in the extract or during the following sedimentation step. However, Hinchcliffe *et al.* (1999), using a polarized-light microscope to monitor the asters formed by sperm head centrosomes, demonstrated a link between cell cycle control and the regulation of centrosome duplication. An alternative approach was also developed previously, in which centrosomes isolated from somatic cells were used as starting material (Tournier *et al.*, 1991). In this approach, centrosome duplication was monitored by immunofluorescence after sedimentation of the centrosomes on to a coverslip. This approach suffered similar drawbacks and involved a number of manipulations before the analysis could be done, potentially introducing a number of artifacts. Another attempt has been reported using clam egg extracts in which one follows the "reassembly" of functional centrosomes from maternal stores (Schnackenberg *et al.*, 1998). Such a system has the great advantage of being optically transparent, allowing one to easily monitor the presence of centrosome-centered asters of microtubules by light microscopy. A new assay has been developed using *Xenopus* lysate (Piel and Bornens, 1998), which is detailed here.

---

---

---

## II. Logic of the Assay

*Xenopus* egg extracts are the most characterized cell-free systems in which one can hope to observe not only centrosome assembly, but also cell cycle-dependent regulation of this pathway. Each egg contains enough precursor protein to assemble thousands of centrosomes, and the transition between interphase and mitosis can be controlled easily.

In order to design a new strategy for developing a centrosome duplication assay in a *Xenopus* egg extract, we wanted to start with centrosomes that meet four requirements: (1) they should be freshly prepared, in order to avoid any additional difficulty due to centrosome freezing and thawing; (2) they should be attached to a solid support in order to allow easy observation and to avoid a sedimentation step; (3) they should come from synchronized cells, early in the cell cycle when centrosome duplication has not yet been initiated; and (4) they should be distinguished easily from the daughter centrosomes assembled during the assay by light microscopy to allow a rapid and large sampling of events. This final point is critical as centrosome duplication is principally monitored

by the budding of a procentriole orthogonal to each of the two parental centrioles. In that configuration, parental and daughter centrioles are tightly associated, their mutual distance being at the limit of optical resolution.

The main feature of the assay described is to use *in situ* centrosomes instead of isolated centrosomes. We used Triton X-100-extracted cytoplasts prepared from mouse L929 cells for which established enucleation protocols exist. This has several advantages: in the absence of nuclei, cytoplasts are very flat (about 3  $\mu\text{m}$ ) and are attached stably to the coverslip on which the cells are grown. Their cytoplasmic compartments are distributed about the centrosome, which sits at the geometric center of the cytoplast (Wise and Prescott, 1973). Thus cytoplasts from early G1 cells provide a favorable starting material, as their centrosome has not yet initiated the structurally identifiable steps of duplication. After Triton X-100 treatment of these cytoplasts, cytosolic and most membrane components are removed and the centrosome maintains its interactions with the remaining cytoskeleton, even in the absence of microtubules. The centrosome at the center of each cytoplast ghost can then be placed in contact with a freshly prepared *Xenopus* mitotic egg extract. Finally, in order to mark parental centrosomes, we use cells stably expressing a GFP-HsCEN1 construct. We have previously shown that centrin is concentrated in the distal lumen of centrioles in animal cells (Paoletti *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 1997) and that overexpression of several tagged versions of centrin 1 or 2 can rapidly concentrate at the same localization (S. Middendorp *et al.*, in preparation). In GFP-HsCEN1-expressing cells, each centrosome contains a pair of centrioles, which can be visualized directly and precisely (Piel *et al.*, 2000). In order to improve the monitoring of centrosome duplication, rhodamine-tubulin is also added to the extract to label daughter centrioles assembled during the assay and to distinguish them from GFP-labeled parental centrioles. With such an approach, the four requirements listed earlier are met.

---

---

---

### III. Duplication Assay

#### A. Preparation of Centrosomes

##### 1. Cell Culture and Cell Cloning

L929 cells are grown in Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum. Hs-Centrin1 cDNA was subcloned into the pEGFP-N1 vector (Clontech). The HsCen 1 fragment was amplified to create *KpnI* and *BamHI* sites. Cells are transformed by electroporation. Stable clones expressing the centrin/GFP fusion protein can then be isolated by using the limited dilution method in the presence of 500  $\mu\text{g/ml}$  G418 (Gibco). *Note:* It is rather easy to establish stable cell lines expressing Hs-centrin 1 as overexpression of that protein does not perturb cell growth.

Transfection of this vector gives a high efficiency: almost 80% of the cells express GFP-Cen1p after 24 h. Among them, around 30% express it at a very high level without an apparent phenotype. Incorporation of GFP-Cen1p into the lumen of the centrioles but also into surrounding insoluble tiny structures, described previously by immunostaining

(Baron and Salisbury, 1994), is observed within a few hours after transfection. Nevertheless, the majority of the centrin protein, both the endogenous and the overexpressed, is in a soluble cytoplasmic pool. In fact, a limited amount of centrin can be incorporated into insoluble structures. Examination of extracted cells revealed a homogeneous expression of GFP-centrin. If centrin is overexpressed to a greater extent, the cytoplasmic pool but not the centriolar content will increase. Thus in cells overexpressing a large excess of GFP-centrin, centrioles are not visible against the background unless the cells are extracted before visualization. It is worth selecting transfected cells for 2 weeks in G418 and then subcloning a cell line that expresses enough centrin to have a strong labeling of the centrioles but with a minimal cytoplasmic background.

## 2. Materials

Thymidine (Sigma, ref: T 1895), stock: 100 mM in phosphate-buffered saline (PBS).  
Deoxycytidine (ICN, ref: 101484), stock: 30 mM in water.

Cytochalasin D (CD; Sigma, ref: C8273), stock: 5 mg/ml in dimethyl sulfoxide (DMSO).

Collagen type I (Sigma, ref: C7661), stock: 2.5 mg/ml in H<sub>2</sub>O plus 3% acetic acid  
Fibronectin (Sigma, ref: F1141)

XB buffer: 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM potassium HEPES, pH 7.7, 50 mM sucrose

XB-CSF buffer: XB buffer plus 5 mM EGTA, pH 7.7

Extraction buffer: Triton X-100 0.5% (v/v) in XB-CSF buffer

## 3. Procedure

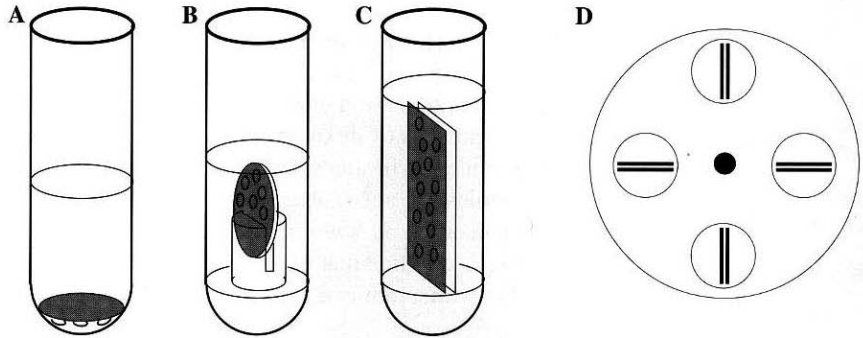
### a. Cell Synchronization and Plating

Synchronization in early G<sub>1</sub> is accomplished by a single thymidine block for 20 h (5 mM thymidine). Cells are released from the block in culture medium equilibrated for 2 h in the incubator and supplemented with 30 μM deoxycytidine. Mitotic cells are then collected by shake off 8 h after releasing the block. Cells are then replated on coverslips coated with collagen and fibronectin and used 2 h later. The coating is performed as follows: coverslips are incubated for 1 h at 37°C with a mixture of collagen (20 μg/ml) and fibronectin (1 μg/ml) in water. They are then rinsed gently with PBS.

### b. Cell Enucleation

Enucleation is performed as described by Prescott *et al.* (1972). Coverslip cultures are incubated at 37°C for 30 min in the presence of 1.5 μg/ml cytochalasin D and then centrifuged at 15,000g for 40 min at 37°C in the presence of CD. The cytoplasts are then rinsed with fresh drug-free medium and incubated for 2 h at 37°C prior to use.

*Notes.* Several cell lines have been used for enucleation: CHO and L929 (Prescott *et al.*, 1972), L6 myoblasts (Ege *et al.*, 1974), BHK21 (Goldman *et al.*, 1975), HeLa (Celis and Celis, 1994), and BSC-1 (Rodionov *et al.*, 1999). For each different cell line, the protocol just given has to be adapted. The main parameters are (1) the cytochalasin



**Fig. 1** Some enucleation devices. (A) For 12-mm coverslips, just put the coverslip with the cells down in a 15-ml Corex tube with some culture medium and CD. Manipulation of the coverslip is not very easy and if it is up-side down, it will not work. (B) For any coverslip (in a 15-ml Corex tube for 12-mm coverslips or 50 ml for larger ones), cut a slit in a plastic cylinder. We found that enucleation efficiency is better when cells are mounted this way and manipulations are easier. The holding device must be well adapted for the coverslip or else the coverslip will break. (C) It is possible to enucleate cells seeded on slides. The diameter of the centrifugation tube must fit the width of the slide. If the slide is free to move, it will break. If slides are too narrow for the tube, stabilize them with Parafilm. (D) Important note: when the tube is put in the centrifuge, the plane of the slide must be radial (even in a swinging rotor) or else the slide will break.

D concentration, which enables a good depolymerization of the actin network, and (2) the attachment of the cells to the substrate, which must be strong enough to resist centrifugation. The anchoring can be improved by modulating the coating of the substrate used for enucleation. If the amount of CD or the anchoring of the cells is not correct, the yield of enucleated cells can be very low. Once a reasonable percentage of cytoplasts is obtained, the centrifugal force can be modified slightly to optimize the efficiency. It is better if the centrifugal force is exerted parallel to the substrate. Different devices can be used to adapt to different coverslips or slides (Fig. 1).

### c. *Permeabilization of Cytoplasts*

Cytoplasts are treated with 0.5% Triton X-100 for 30 s in XB-CSF or in XB buffer used for the preparation of egg extracts (Murray, 1991), depending on the type of extract, mitotic or interphase, in which cytoplasts will be incubated. They are then rinsed twice in either XB-CSF or XB buffer.

## B. Duplication Assay

Figure 2 (see Color Plate) shows the various steps used in this assay.

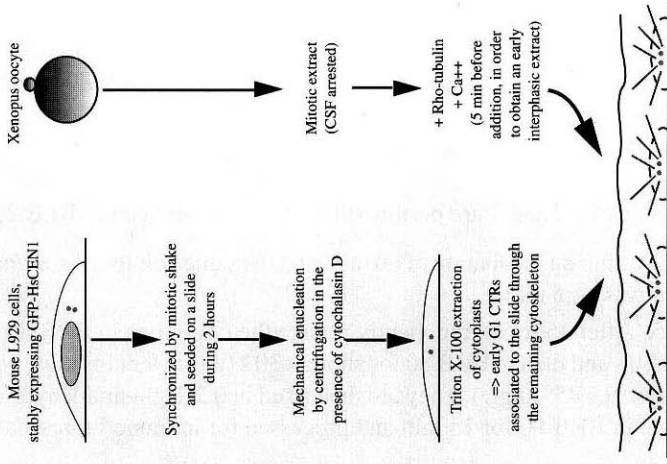
### 1. Materials

All the buffers needed for *Xenopus* egg extract preparation (see Murray, 1991)

Rhodamine-tubulin (Tebu)

BRB 80: 80 mM K·PIPES, pH 6.8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA

### A. Cell-Free Assay for Centrosome Duplication



### B. Schematic evolution of structures in the extract

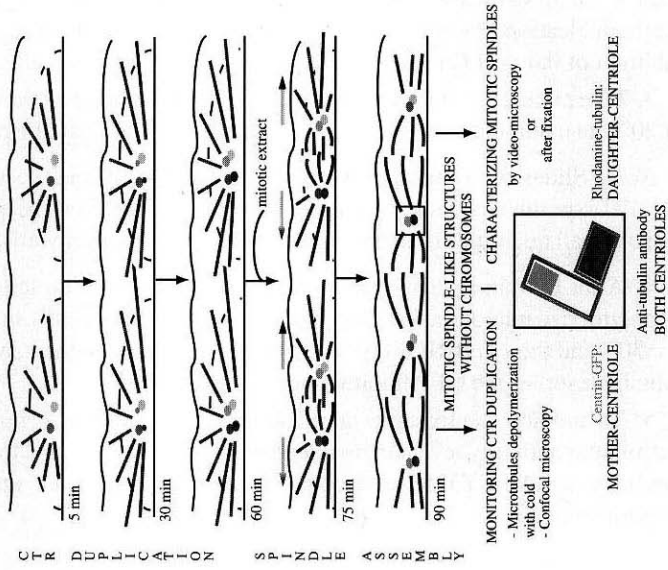


Fig. 2 A schematic representation of the assay. (See Color Plate.)

## 2. Procedure

1. Prepare permeabilized cytoplasts, as described previously.
2. Prepare low-speed (15,000g) *Xenopus* egg extracts blocked in metaphase II of meiosis (CSF extracts) as described by Murray (1991) while cytoplasts are recovering after enucleation. Interphase extracts are prepared from these low-speed extracts by the addition of 0.4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Add 0.1 mg/ml of rhodamine-tubulin.
3. Five minutes after the addition of  $\text{Ca}^{2+}$ , lay the extract on the cytoplasts and incubate at 20°C in a humid chamber. One should use from 1 to 2  $\mu\text{l}$  of extract for  $10^3$  cytoplasts.

*Note:* Slides with multiple wells (Polylabo, 74913) can be very useful to perform parallel experiments. Moreover, the volume of these wells can be quite small, allowing the use of small quantities of extract (10  $\mu\text{l}$  for 5-mm diameter wells seeded with  $10^4$  cells).

4. After 60 min at 20°C, the coverslips are incubated on ice for 10 min in order to depolymerize microtubules. They are then plunged very gently in BRB80 + 0.5% Triton for 30 s and then in BRB 80 for another 30 s and fixed in methanol at -20°C for 3 min, which preserves the GFP fluorescence.

5. To monitor centrosome duplication unambiguously, centrioles are stained with antitubulin antibody revealed by a secondary antibody coupled to AMKA. A convenient antibody is mAb GT335 (see Bobinnec *et al.*, 1998) directed against polyglutamylated tubulin (Wolff *et al.*, 1992).

## C. Spindle Assay

### 1. Introduction

It can also be interesting to follow the evolution of the microtubule array nucleated by the duplicating centrosomes. For that purpose, the following procedure can be modified.

### 2. Procedure

Steps 1, 2, and 3 are performed as described in Section III,B,2

4. After an incubation of 60 min, add the same volume of starting CSF-arrested extract that was kept on ice.

5. After 15 to 30 min, gently plunge the coverslips in BRB 80 + 0.5% Triton X-100 for 30 s and then in BRB 80 for another 30 s (the coverslips must be slowly plunged in the buffer at a 45° angle). They are then fixed in 0.2% glutaraldehyde and 3% paraformaldehyde in BRB 80 for 15 min and processed for immunofluorescence.

One may fix microtubule arrays after 1 h of incubation only, when the extract is still in interphase. The washing out of the extract must be done very carefully, as the extract is more viscous at that stage and centrosomes could be removed from the coverslip together with the extract.

### 3. Alternative Procedure

One can use centrosomes from G2 cells and incubate them directly with CSF extract: the two centrosomes from each cytoplasm will separate and form spindles. It is also possible to use permeabilized cells with nuclei rather than permeabilized cytoplasts. If this is the case, cells should be under 1/4 confluency, as otherwise the centrosomes connect to surrounding chromosomes and the figures obtained are uninterpretable.

---

---

---

## IV. Major Pitfalls

1. If cells cannot be enucleated, the quality of the CD must be questioned.
2. It is difficult to know whether a given egg extract will be good enough to allow centrosome duplication. The same egg extract can sometimes trigger the assembly of spindles on isolated sperm heads and yet not allow centrosome duplication.
3. Major pitfalls come from the removal of the extract before fixation. It is essential to remove all the extract, as otherwise the preparation is too dense for operation. However, if this step is not done carefully, cytoplasts and centrosomes can be removed, and nothing will be left on the coverslip. It requires some practice.

---

---

---

## V. Discussion

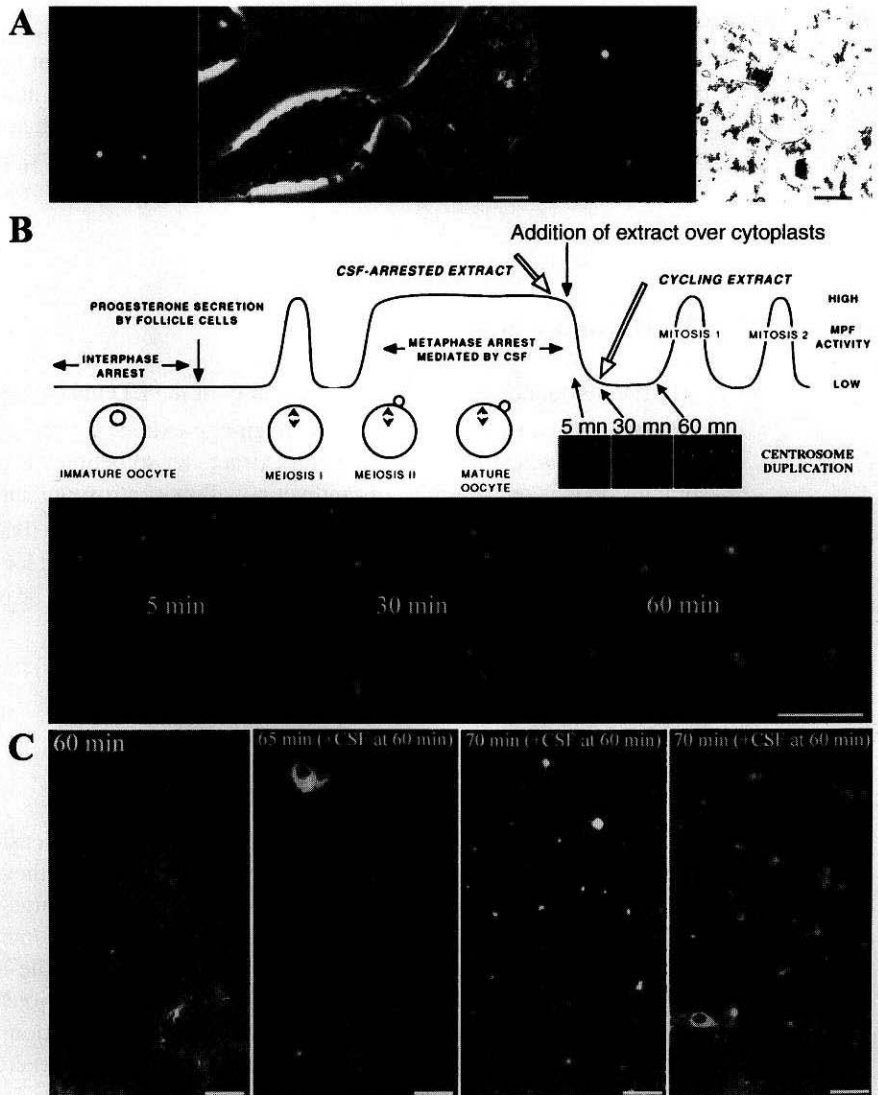
### A. General Comments

The mitotic progression of the extract can be monitored easily by observing the behavior of the microtubules nucleated by centrosomes, as they demonstrate a dramatic change in their dynamics at the onset of mitosis. This turns out to be convenient to monitor duplication of the centrosomes, as daughter centrosomes separate from each other at the onset of mitosis, forming bipolar microtubule spindle-like structures. These bipolar structures, which contain a single GFP-containing centriole at each pole, provide a visually convincing demonstration that centrosome duplication has occurred. These bipolar structures interact with each other progressively and generate a regular array of similar structures.

### B. The Starting Centrosomes

Expressing a GFP-tagged centrin in L929 cells provides a precise vital staining of the two centrioles in the centrosome (Piel *et al.*, 2000). Centriole budding and centrosome separation at the onset of mitosis can be monitored easily. L929 cells were chosen because they can be enucleated easily. The resulting cytoplasts can survive more than 50 h in culture, and their centrosomes do not duplicate if cells are enucleated





**Fig. 3** (A) The starting centrosomes. Two early G1 cytoplasts are shown. Centrin-GFP staining is shown with a 4 $\times$  magnification on both sides of the phase-contrast image. The centrin-GFP image was also overlaid in green onto the phase-contrast image (bar: 5  $\mu$ m). The right side shows an EM picture of centrioles from an early G1 cytoplasts (bar: 1  $\mu$ m). Note that no procentriole is visible, neither with the centrin-GFP staining nor at the EM level. (B) Duplication of centrosomes. (Top) Adapted from Murray (1991). (Bottom) To monitor centrosome duplication, the centriole pair in individual centrosomes was examined by confocal laser microscopy after depolymerizing the microtubules extensively. This preparation was fixed by a 3-min cold methanol treatment, compatible with GFP and rhodamine fluorochromes (shown in green and red, respectively); it was then incubated with an antitubulin mAb revealed by an antimouse antibody coupled to AMCA (shown in magenta). Progressive procentriole budding is shown for two centrosomes at each time point.

during  $G_1$  (up to 7 h after the mitotic shake). However, they can apparently complete duplication if cells are enucleated at the  $G_1/S$  border. We have observed that the reproduction can go as far as four dissociated centrioles when starting with cells enucleated in  $G_2$ .

To obtain centrosomes at different stages of their duplication cycle, cells can be synchronized at the  $G_1/S$  border using the double-thymidine block technique. In order to determine the duration of S and  $G_2$ , cells can be incubated at various times after the thymidine washout with 30  $\mu M$  BrdU for 15 min and then analyzed by FACS. The maximum number of S-phase cells (by BrdU incorporation) is reached 1–4 h after release. The maximum number of  $G_2$  cells (double DNA content and no BrdU incorporation) is observed  $\sim 5$  h after release.  $G_2$  centrosomes can be obtained by using cells 5 h after release from the second thymidine block.

It is possible in such an assay to test independently the role of a given protein present in the extract or brought by the centrosome by pretreating the extract and/or the centrosomes independently before incubating them together (Fig. 3A, see Color Plate).

### C. Duplication of Centrosomes

To monitor centrosome duplication (Fig. 3B), the centriole pair in individual centrosomes is examined by confocal microscopy. Confocal optics is absolutely required for this monitoring, as budding procentrioles are closely associated with the parental centrioles and the orientation of the two orthogonally growing buds about their respective parental centrioles is random.

A remarkable feature of this assay is that, in a given extract, each individual centrosome progressed similarly in their duplication. When the extract is good, all centrosomes apparently duplicate at the same pace. This all or none rule is indeed a very convincing feature of the assay, given the difficulty of observation of each individual event.

At time 60 to 90 min in a good extract, all centrosomes display a pair of double tubulin-containing dots, easily distinguishable from the pair of single tubulin-containing dots displayed at the start of the incubation. However, once the extract is driven into the mitotic state, evolution of the system is rather rapid, leading first to the separation of the daughter centrosomes from each other and then to the frequent

---

Between 5 and 60 min, duplicating centrosomes display a pair of double tubulin-containing dots, easily distinguishable from the pair of single tubulin-containing dots displayed at the start of the incubation (bar: 4  $\mu m$ ). (C) Evolution of the microtubule array. As soon as the egg extract is added to the opened cytoplasts, numerous rhodamine-labeled microtubules can be observed growing from each individual centrosome. (Left) During the 60-min interphase period, GFP-labeled parental centrioles can be observed, but the progress of their duplication cannot be monitored by tubulin–rhodamine staining without depolymerizing the growing microtubules. (Right) After 60 min, a dramatic change in microtubule makes dynamics them shorter, resulting in the easier observation of centrosomes. Progressive splitting in two of the microtubule nucleating centers can be observed. The presence of one single GFP dot in each pair of nucleating centers suggests that these pairs correspond to the separation of duplicated centrosomes (bars: 12.5  $\mu m$ ). (See Color Plate.)

splitting of the mother and daughter centrioles in a given centrosome. This could render the analysis more difficult.

#### D. Evolution of the Microtubule Array

As soon as the egg extract is in contact with the extracted cytoplasts, numerous rhodamine-labeled microtubules can be observed growing from each individual centrosome. They fill the whole volume of the extract rapidly. During the 60-min interphase period, GFP-labeled parental centrioles can be observed, but the progress of their duplication cannot be monitored without depolymerizing the growing microtubules. After 60 min, however, a dramatic change in microtubules dynamics makes them shorter and renders the observation of the centrosomes easier. Moreover, a progressive splitting in two of the microtubule nucleating centers can be observed. Progressively, the pairs of nucleating centers separate from each other and their microtubules appear to interact with microtubules originating from neighboring centers, eventually forming a regular array of hexagonally distributed centers. At 90 min, the presence of a few typical metaphase chromosomes in rare nonnucleated cells present in the preparation demonstrated directly that the extract had reached a full mitotic state (Fig. 3C).

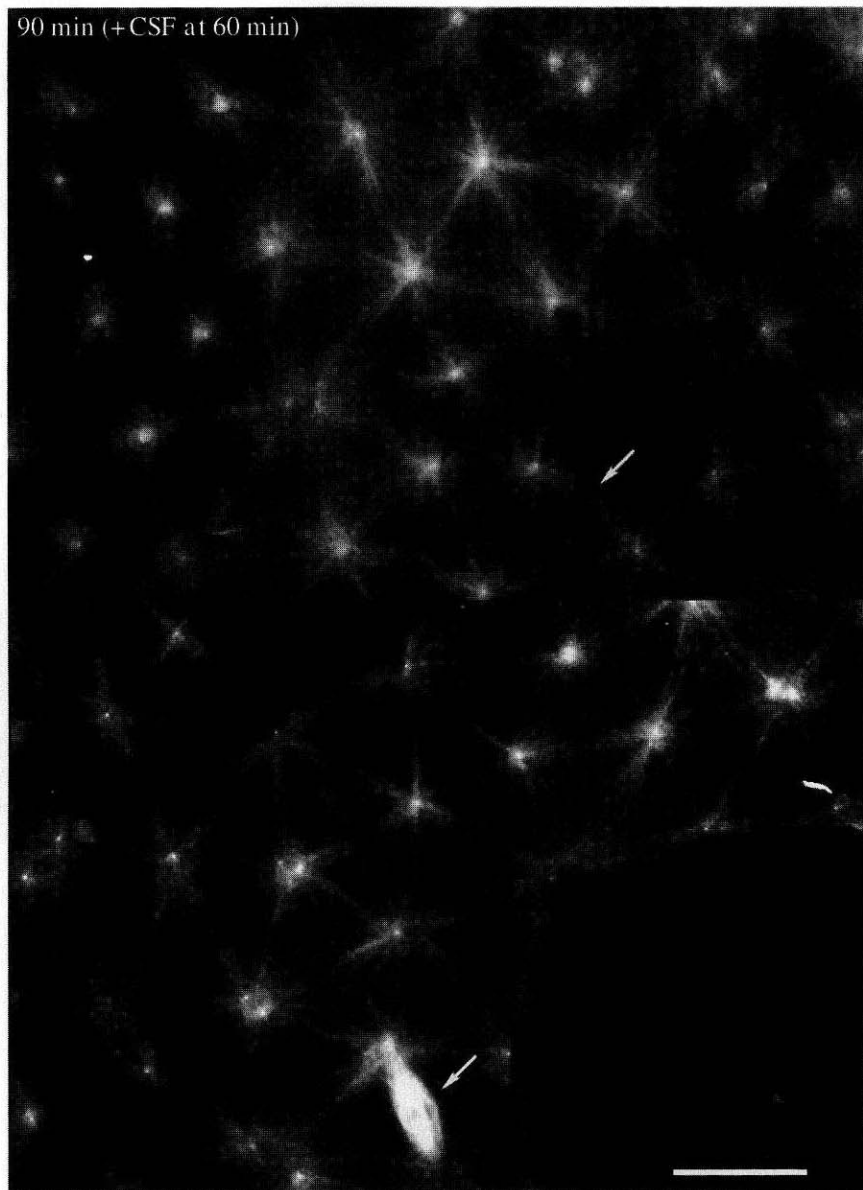
#### E. Assembly of Mitotic Spindle-like Structures without Chromosomes

An unexpected outcome of this assay is that duplicated centrosomes separate from each other when the extract is driven into mitosis. We believe that this is due to the fact that the starting centrosomes from Triton-extracted cytoplasts maintain their normal and as yet unknown association with cytoskeletal structures other than microtubules (see Piel *et al.*, 2000) and that these cytoskeletal structures “respond” to the extract driven into mitosis, just like they do in cells at the onset of mitosis.

Thus the separation of centrosomes at the onset of mitosis apparently does not require the presence of the nucleus nor does it involve the actin system, which in our conditions is impaired by the presence of CD.

Due to the presence of few nonnucleated cells in the preparations, one can be convinced easily that one is dealing with the assembly of mitotic spindles in the absence of chromosomes, despite the fact that these spindles are most often participating eventually in an array of regularly spaced centrosomes nucleating microtubules to form a hexagonal design. We believe that the presence of CD in the extract precludes the organization of actin filament-containing systems, thus allowing the promiscuous interaction of microtubule asters with each other independently of the origin of the nucleating centrosomes instead of restricting them to the interaction between asters from sister centrosomes.

The size of these a-chromosomal spindles is strikingly similar to that found in rare mitotic spindles found on coverslips that display a metaphase plate of chromosomes. An interdigitation of microtubules at the midzone of these a-chromosomal spindles can be observed directly (see arrows on Fig. 4). Several proteins involved in mitotic spindle assembly are currently under study in this system (M. Piel *et al.*, in preparation).



**Fig. 4** The assembly of mitotic spindle-like structures. Thirty minutes after the addition of the CSF extract on centrosomes already incubated for 60 min with an interphase extract, the presence of few typical metaphase chromosomes due to rare nonnucleated cells in the preparation confirmed that the extract is mitotic (bottom arrow). The pairs of nucleating centers have separated from each other and their associated microtubules appear to interact with those originating from neighboring centers, eventually forming a regular array of hexagonally distributed centers. Interdigitated microtubules are clearly visible (top arrow) (bar: 25  $\mu\text{m}$ ).

---

---

---

## VI. Prospects

### A. Monitoring the Assay by Video or Electron Microscopy

#### 1. Video Microscopy

It is very easy to adapt the protocol described to follow the microtubule dynamics by video microscopy. One can use the classical techniques used for the visualization of the dynamics of microtubules nucleated by a centrosome (e.g., in Tournebize *et al.*, 1997, or on Mitchison Lab Homepage website at [www.skye.med.harvard.edu](http://www.skye.med.harvard.edu)).

#### 2. Electron Microscopy (EM)

As they are attached to the coverslip, centrosomes can be fixed for flat embedding. In this case, it is not necessary to remove the extract. Coverslips can be plunged directly in BRB 80 containing 2% glutaraldehyde and processed for EM. The use of Cellocate (Eppendorf) coverslips enables EM study of cells previously observed in light microscopy. It is useful, at least once, to make sure that the double dot seen in fluorescence really corresponds to a diplosome (for detailed protocols on correlative light and electron microscopy, see Rieder and Cassels, 1999, or the Borisy Lab Group website at [www.borisy.bocklabs.wisc.edu](http://www.borisy.bocklabs.wisc.edu)).

### B. Stepwise Centrosome Duplication

Centrosome duplication is usually described as involving three independent structural steps, each occurring at a particular phase of the cell cycle: formation of a procentriole adjacent and orthogonal to each previous centriole during  $G_1/S$ ; separation of the two pairs of centrioles during  $G_2/M$ ; and separation of the two centrioles of each pair during  $M/early G_1$  (see Piel *et al.*, 2000).

Using cells that are synchronized at different points of the cell cycle makes it possible to study each step of centrosome duplication independently in *Xenopus* extracts (M. Piel *et al.*, in preparation). This will be important as it enables the more precise analysis of the requirement for any particular protein in the centrosome duplication pathway.

### C. Spindle Assays

It has been demonstrated by several means that both centrosomes alone (Nagano *et al.*, 1981; Picard *et al.*, 1988) and chromosomes alone (Szollosi *et al.*, 1986; Khodjakov *et al.*, 2000) are able to assemble bipolar spindles *in vivo*. Spindles assembled by chromosomes alone are sufficient for proper separation of the sister chromatids. However, several studies now demonstrate that the “centrosomal spindle” is instrumental in the positioning of the mitotic apparatus relative to the cell cortex and for establishing the constriction ring in cytokinesis. Moreover, the “centrosomal spindle” is sufficient to trigger “anaphase” and cytokinesis (Zhang and Nicklas, 1996).

It would thus be interesting to compare *in vitro* the mechanisms and the molecules involved in the assembly of these two architectures that are the “chromatin spindles” and the “centrosomal spindle.” There is already a widely used *in vitro* assay for a-centrosomal spindle formation (Heald *et al.*, 1996).

The present assay will be helpful not only in investigating the formation of the “centrosomal spindle,” but also in understanding how both types of spindles are integrated in a single apparatus. For example, one could add purified chromosomes or DNA beads in the spindle assay described in Section III,C. The image presented in Fig. 4 seems to indicate that these two structures are overlapping and that even in a complete spindle there may be really two independent sets of microtubules regulated by distinct molecules; one ensuring the proper division of the cytoplasm and the other ensuring the separation of the sister chromatids. When both are integrated, the cytoplasmic compartment and the nuclear compartment are properly divided in two.

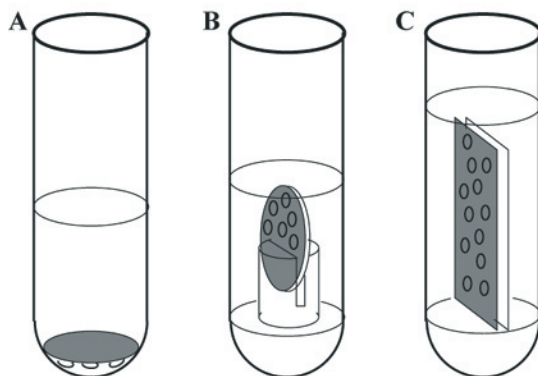
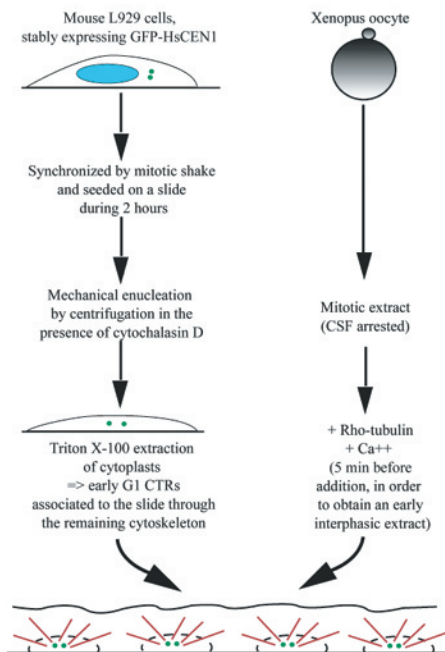
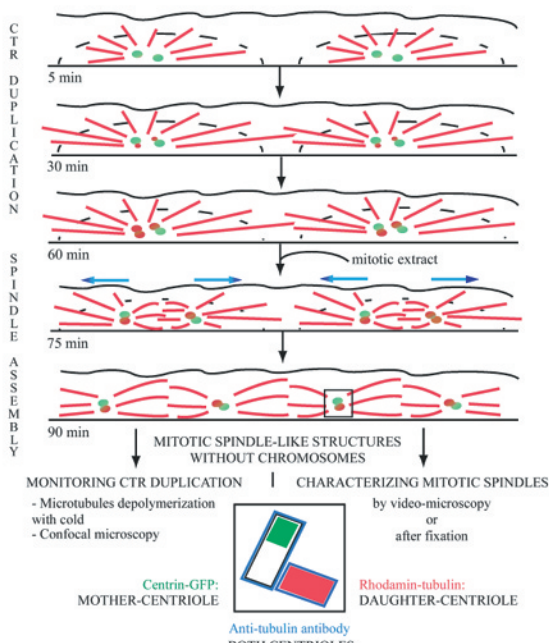
## Acknowledgments

We thank Dr. Manfred Lohka for an enlightning discussion in the initial design of this assay, Yann Abraham for the plasmid containing the fusion gene between GFP and centrin 1, and Thomas Kuntziger for help with the egg extracts.

## References

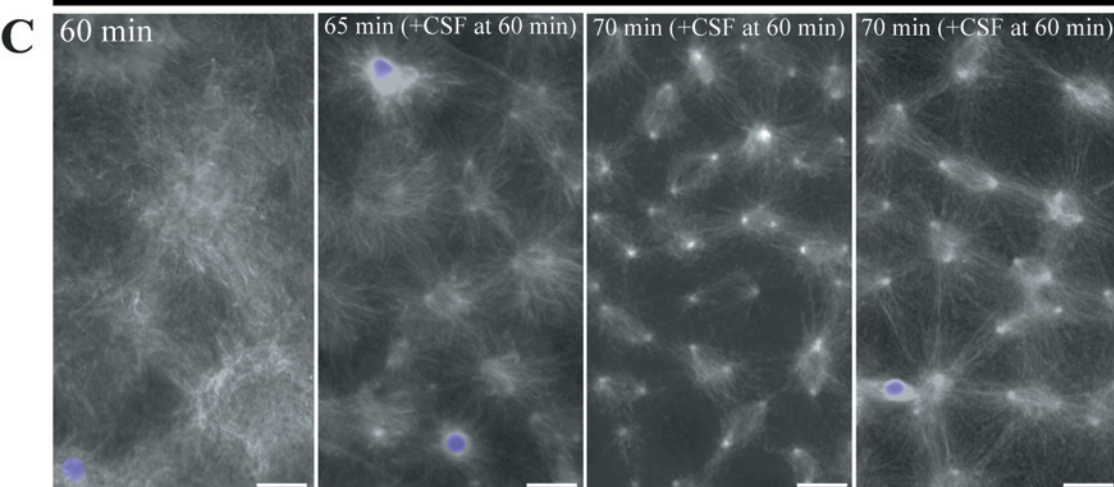
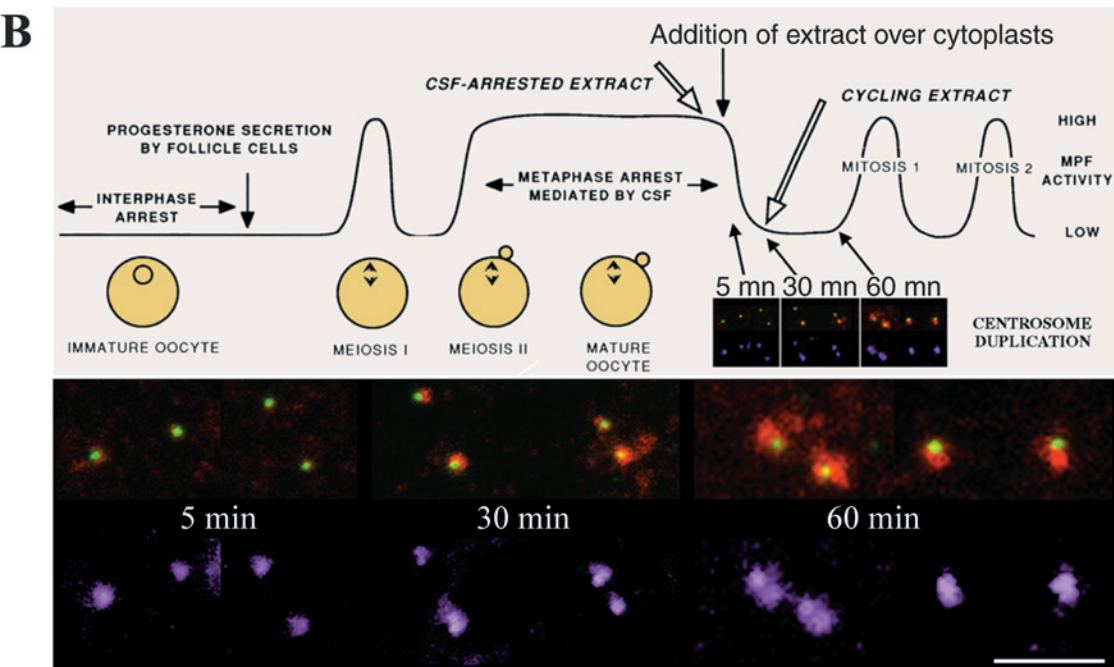
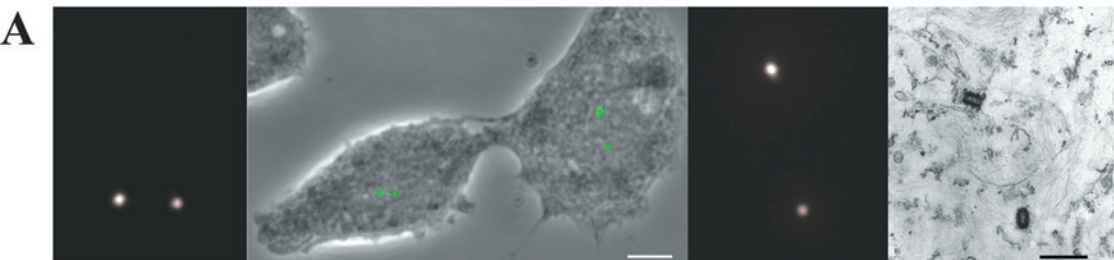
- Adams, I. R., and Kilmartin, J. V. (2000). Spindle pole body duplication: A model for centrosome duplication. *Trends Cell Biol.* **10**, 329–335.
- Baron, A. T., Suman, V. J., Nemeth, E., and Salisbury, J. L. (1994). The pericentriolar lattice of PtK2 cells exhibits temperature and calcium-modulated behavior. *J. Cell Sci* **107**, 2993–3003.
- Bobinac, Y., Moudjou, M., Fouquet, J. P., Desbruyeres, E., Edde, B., and Bornens, M. (1998). Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil. Cytoskel.* **39**, 223–232.
- Bornens, M. (ed.) (1999). The centrosome. *Biol. Cell* **91**, 289–477.
- Bullitt, E., Rout, M. P., Kilmartin, J. V., and Akey, C. W. (1997). The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell* **89**, 1077–1086.
- Ege, T., Hamberg, H., Krondahl, U., Ericsson, J., and Ringertz, N. R. (1974). Characterization of minicells (nuclei) obtained by cytochalasin enucleation. *Exp. Cell Res.* **87**, 365–377.
- Gard, D. L., Hafezi, S., Zhang, T., and Doxsey, S. J. (1990). Centrosome duplication continues in cycloheximide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle. *J. Cell Biol.* **110**, 2033–2042.
- Goldman, R. D., Pollack, R., Chang, C. M., and Bushnell, A. (1975). Properties of enucleated cells. *Exp. Cell Res.* **93**, 175–183.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., and Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* **382**, 420–425.
- Hinchcliffe, E. H., Li, C., Thompson, E. A., Maller, J. L., and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* **283**, 851–854.
- Johnson, K. A., and Rosenbaum, J. L. (1991). Basal bodies and DNA. *Trends Cell Biol.* **1**, 145–149.
- Khodjakov, A., Cole, R. W., Oakley, B. R., and Rieder, C. L. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr. Biol.* **10**, 59–67.
- Kuriyama, R., and Borisy, G. G. (1983). Cytasters induced within unfertilized sea-urchin eggs. *J. Cell Sci.* **61**, 175–189.

- Middendorp, S., Kuntziger, T., Abraham, Y., Holmes, S., Bordes, N., Paintrand, M., Paoletti, A., and Bornens, M. (2000). A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J. Cell Biol.* **148**, 405–416.
- Middendorp, S., Paoletti, A., Schiebel, E., and Bornens, M. (1997). Identification of a new mammalian centrin gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9141–9146.
- Mignot, J. P., Brugerolle, G., Didier, P., and Bornens, M. (1993). Basal-body-associated macromolecules: A continuing debate. *Trends Cell Biol.* **3**, 220–223.
- Murray, A. W. (1991). Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* **36**, 581–605.
- Nagano, H., Hirai, S., Okano, K., and Ikegami, S. (1981). A chromosomal cleavage of fertilized starfish eggs in the presence of aphidicolin. *Dev. Biol.* **85**, 409–415.
- Paoletti, A., and Bornens, M. (1997). Organisation and functional regulation of the centrosome in animal cells. *Prog. Cell Cycle Res.* **3**, 285–299.
- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J. L., and Bornens, M. (1996). Most of centrin in animal cells is not centrosome associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.* **109**, 3089–3102.
- Picard, A., Harricane, M. C., Labbe, J. C., and Doree, M. (1988). Germinal vesicle components are not required for the cell-cycle oscillator of the early starfish embryo. *Dev. Biol.* **128**, 121–128.
- Piel, M., and Bornens, M. (1998). A cell free assay for centrosome duplication and the formation of mitotic spindle-like structures without chromosomes. *Mol. Biol. Cell* **9**, 12a.
- Piel, M., Mejer, P., Khodjakov, A., Rieder, C. L., and Bornens, M. (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to the centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* **149**, 317–329.
- Prescott, D. M., Myerson, D., and Wallace, J. (1972). Enucleation of mammalian cells with cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* **71**, 480.
- Rieder, C. L., and Cassels, G. (1999). Correlative light and electron microscopy of mitotic cells in monolayer cultures. *Methods Cell Biol.* **61**, 297–313.
- Rodionov, V., Nadezhdina, E., and Borisy, G. (1999). Centrosomal control of microtubule dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 115–120.
- Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1991). Mitotic spindle assembly by two different pathways in vitro. *J. Cell Biol.* **112**, 925–940.
- Schiebel, E. (2000).  $\gamma$ -Tubulin complexes: Binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr. Op in. Cell Biol.* **12**, 113–118.
- Schnackenberg, B. J., Khodjakov, A., Rieder, C. L., and Palazzo, R. E. (1998). The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 295–300.
- Szollosi, A., Ris, H., Szollosi, D., and Debec, A. (1986). A centriole-free *Drosophila* cell line: A high voltage EM study. *Eur. J. Cell Biol.* **40**, 100–104.
- Tournebize, R., Andersen, S. S. L., Verde, F., Doree, M., Karsenti, E., and Hyman, A. A. (1997). Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *EMBO J.* **16**, 5537–5549.
- Tournier, F., Cyrklaff, M., Karsenti, E., and Bornens, M. (1991). Centrosomes competent for parthenogenesis in *Xenopus* eggs support pro-centriole budding in cell-free extracts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**, 9929–9933.
- Wilson, E. B. (1925). "The Cell in Development and Heredity." Macmillan, New York.
- Wise, G. E., and Prescott, D. M. (1973). Ultrastructure of enucleated mammalian cells in culture. *Exp. Cell Res.* **81**, 63–72.
- Wolff, A., de Nechaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyeres, E., Audebert, S., Adde, B., Gros, F., and Denoulet, P. (1992). Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* **59**, 425–432.
- Zhang, D. H., and Nicklas, R. B. (1996). "Anaphase" and cytokinesis in the absence of chromosomes. *Nature* **382**, 466–468.

**Fig 1****Fig 2****A. Cell-Free Assay for Centrosome Duplication****B. Schematic evolution of structures in the extract**

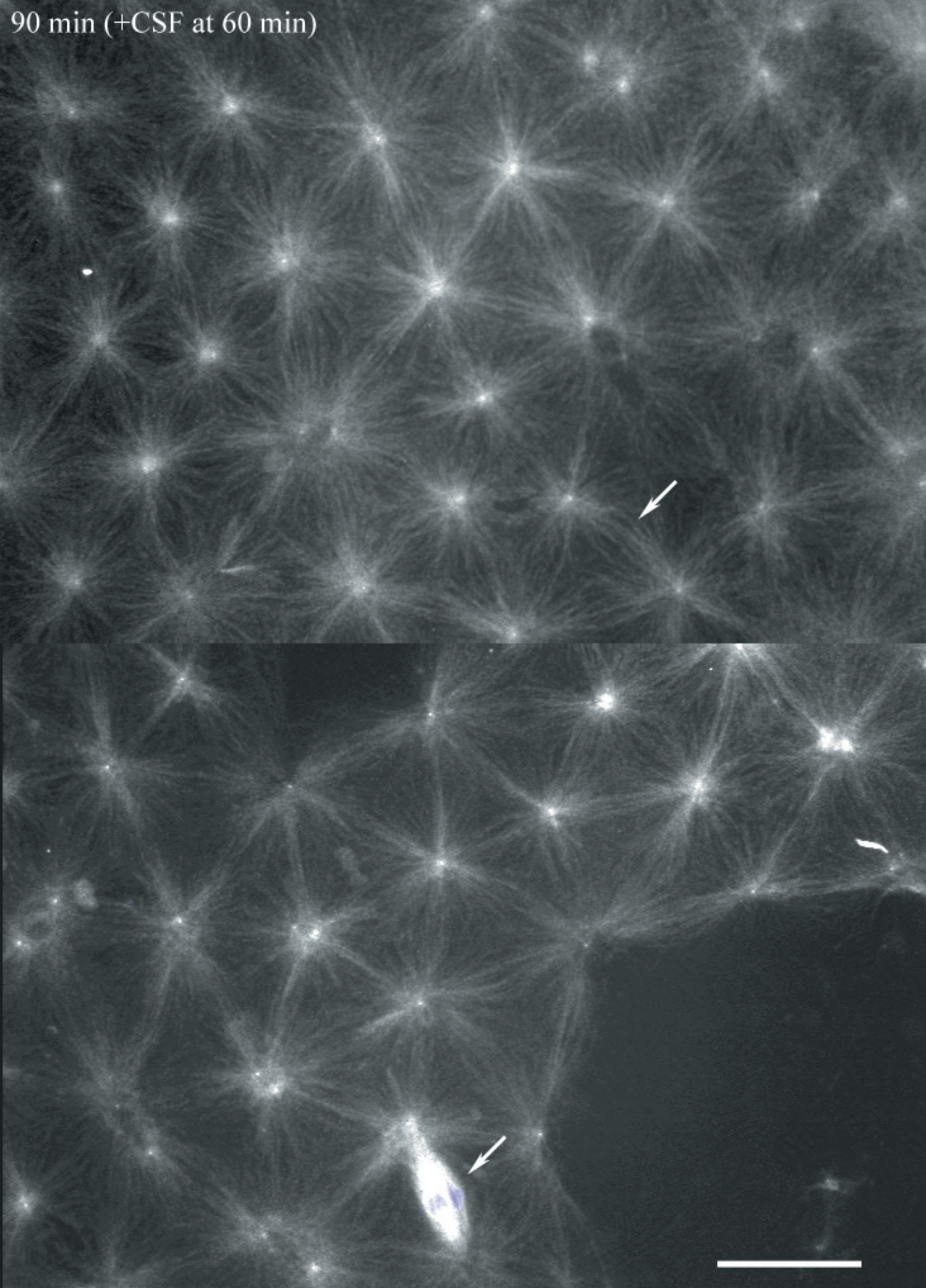








90 min (+CSF at 60 min)





**ANNEXE III : Articles de vulgarisation sur le mouvement cellulaire et ses principes moléculaires (Encyclopaedia Universalis, 2000 et 2001)**



## MOUVEMENT CELLULAIRE

Le mouvement est avec la capacité de reproduction, l'une des propriétés qui définissent le vivant. De nombreux types de mouvements sont observables à l'aide d'un microscope optique conventionnel, d'autres qui se produisent à une échelle de dimensions proches des dimensions moléculaires requièrent des microscopes plus perfectionnés. En effet, les structures spécialisées à l'origine du mouvement comme la myofibrille du muscle, ou le flagelle du spermatozoïde, sont de véritables automates moléculaires dont les dimensions ne sont que légèrement supérieures à celles des macromolécules qui les constituent. Les bases mécano chimiques des mouvements cellulaires reposent toutes sur l'utilisation d'un nucléotide d'adénosine triphosphate (ATP) ou de guanosine triphosphate (GTP), dont l'hydrolyse contrôlée fournit l'énergie nécessaire au mouvement, la liaison entre deux phosphates étant une source d'énergie universelle dans le vivant (cf. MOTILITE).

Si toutes les cellules eucaryotes sont le siège d'intenses mouvements intracellulaires, toutes n'ont pas conservé la propriété de locomotion. Le règne animal et le règne végétal se sont en effet développés avec des stratégies clairement différentes vis-à-vis du mouvement : les cellules végétales, comme les organismes qu'elles constituent, sont incapables de locomotion.

La gamme de vitesse des mouvements observés dans le vivant est très large. Les cellules qui nagent en milieu liquide se déplacent à des vitesses comprises entre 0,1 et 1 millimètre par seconde. Les cellules qui migrent sur une surface sont beaucoup plus lentes, se déplaçant de 0,01 micron par seconde, pour un fibroblaste, à 0,1 micron par seconde pour le leucocyte neutrophile du sang. Des amibes sont capables de se déplacer beaucoup plus rapidement, dépassant les 10 microns par seconde.

Les structures spécialisées dans la motilité peuvent produire des mouvements beaucoup plus rapides. La propagation de l'onde de battement d'un cil ou d'un flagelle chez les eucaryotes est de l'ordre du millimètre par seconde, alors qu'un muscle, ou certaines structures contractiles primitives, peuvent se contracter à des vitesses de l'ordre de 10 à 100 millimètres par seconde. C'est avec de telles performances au niveau des structures élémentaires qu'un champion olympique, et plus encore des animaux sélectionnés au cours de l'Evolution sur leur aptitude à la course, comme le guépard pour capturer des proies, ou le cheval pour fuir des prédateurs, peuvent se déplacer à des vitesses de l'ordre de 10 mètres par seconde grâce à la coordination de leurs muscles assurée par le système nerveux. Ce principe de coordination des actions qui permet d'augmenter les performances lorsqu'on assemble des structures élémentaires est valable à toutes les échelles, des molécules aux organismes (cf. cytosquelette).

Les mouvements intracellulaires se produisent également sur une échelle importante de vitesse. Le transport axonal lent des neurones a une vitesse de l'ordre de 0,01 micron par seconde et le transport rapide de l'ordre de 1 micron par seconde. Le mouvement des chromosomes durant l'anaphase a une vitesse intermédiaire. Certains mouvements intracellulaires peuvent être beaucoup plus rapides, dans des cellules spécialisées comme les mélanophores ou les érythrocytes grâce auxquels certains animaux, comme les poissons, peuvent rapidement changer de couleur pour se confondre avec l'environnement, le mouvement des corpuscules chargés de pigments peut dépasser 10 microns par seconde. Il en va de même pour les courants cytoplasmiques de certaines cellules géantes d'algues, pouvant atteindre une taille de quelques millimètres à plusieurs centimètres. Les courants cytoplasmiques internes de l'amibe *Physarum* sous sa forme plasmode sont plus rapides encore, pouvant atteindre une vitesse de 1 millimètre par seconde.



## I. La locomotion cellulaire

### I.1. La nage

Les cellules ont une taille qui va du micron pour une bactérie (ou cellule procaryote) à quelques dizaines de microns pour les cellules eucaryotes (dont l'ADN est isolé du cytoplasme par une enveloppe). Elles sont donc soumises à des contraintes physiques très différentes de celles que peuvent subir des organismes multicellulaires de grande taille. La viscosité de l'eau domine la physique de leur mouvement, alors que c'est l'inertie qui domine celle des organismes. Les cellules doivent pour se déplacer s'appuyer en permanence sur l'eau qui les entoure. Elles possèdent pour cela des structures spécialisées, les flagelles ou les cils, dont les mouvements sont entretenus par des mécanismes très différents selon qu'ils appartiennent à des bactéries ou à des cellules eucaryotes.

#### *Les procaryotes*

Les bactéries sont si petites (1 micron de long) qu'elles sont soumises de manière violente au mouvement brownien, c'est-à-dire à l'agitation thermique du milieu. Elles sont pourtant capables de se diriger vers des sources de nourriture, ou d'éviter des conditions d'environnement adverses, en se déplaçant à la vitesse considérable, pour leur taille, de 20 à 30 microns par seconde. Le plus souvent, elles le font en utilisant des flagelles qui fonctionnent comme une hélice de bateau. Dans la bactérie intestinale *Escherichia coli* par exemple, chaque flagelle est un filament rigide de 14 millièmes de micron de diamètre et de 10 microns de long, qui tourne à la vitesse incroyable de quelques 200 tours par seconde grâce à un petit moteur rotatif inséré dans la membrane et la paroi de la cellule. Le flagelle ayant une forme d'hélice droite, sa rotation produit une poussée sur le milieu qui entraîne le déplacement de la bactérie dans le sens opposé à la poussée. Les différents flagelles coopèrent pour produire un mouvement rectiligne de la bactérie, en formant une tresse unique compatible avec la forme en hélice droite des flagelles et avec leur rotation individuelle. Un tel mouvement dure de l'ordre de la seconde, après quoi la cellule change brutalement de direction en pivotant sur place, grâce à une inversion du sens de rotation des flagelles, qui est incompatible avec le maintien d'une organisation des flagelles en une tresse unique (figure 2). Une modification de la fréquence des changements de sens de rotation des flagelles provoquée par les signaux de l'environnement auxquels elle est sensible, permet à la bactérie de se diriger (voir plus loin).

Certaines bactéries ont développé un moyen alternatif de déplacement très différent de la nage. Il s'agit des bactéries pathogènes dont le développement dans l'organisme est intracellulaire. Ainsi la bactérie responsable de la listériose (*Listeria monocytogenes*) est capable d'abandonner ses flagelles lorsqu'elle pénètre dans une cellule et d'utiliser à son profit les systèmes d'assemblages de polymères de la cellule hôte pour traverser très rapidement, et envahir de proche en proche, les cellules de l'organisme, échappant ainsi à la surveillance immunitaire. En effet, grâce à certaines molécules qu'elle synthétise et expose à sa surface, cette bactérie peut gouverner l'assemblage de l'actine en microfilaments, formant une structure dite en queue de comète dans son sillage. Ce mécanisme de production de mouvement par simple assemblage de polymères est aujourd'hui l'objet de nombreuses études, car il est un système modèle commode pour la compréhension des mécanismes d'assemblage qui sont à l'origine du mouvement de type amiboïde à l'avant des cellules eucaryotes: il peut être observé dans un extrait acellulaire et intéresse aussi bien les physiciens que les biologistes (voir cytosquelette).

#### *Les unicellulaires ciliés et flagellés (protozoaires)*

Un très grand nombre d'espèces unicellulaires eucaryotes se déplacent grâce à des ciliatures ou à des appareils flagellaires d'une très grande variété, parfois constitués de plusieurs milliers de cils ou de flagelles. Cependant tous les cils et tous les flagelles possèdent, à de rares exceptions près, une structure de base identique, reposant essentiellement sur des microtubules (cf. CELLULE). Les cils ou les flagelles des cellules eucaryotes sont fondamentalement différents des flagelles bactériens, par leur taille, au moins dix fois supérieure en diamètre, par leur fonctionnement (voir plus bas) et par le fait que, tout en se projetant à l'extérieur du corps cellulaire, ils restent entourés de la membrane plasmique et sont donc des organites intracellulaires, au contraire du flagelle bactérien. La distinction entre cil et flagelle repose sur leur type de battement et non sur leur structure. La différence entre les battements des cils et des flagelles explique que les flagelles soient souvent nettement plus longs que les cils. Les flagelles poussent ou tirent le corps cellulaire grâce à des trains d'ondes symétriques qui se propagent d'une extrémité à l'autre. Les cils fonctionnent davantage comme des rames, ou comme les bras d'un nageur, et ont un mouvement asymétrique dans lequel on peut distinguer une phase active d'appui sur le liquide environnant, et une phase de récupération qui ne produit pas de mouvement. Ces battements ciliaires ou flagellaires ne sont pas entièrement stéréotypés cependant. Les protozoaires sont capables en effet d'une grande variété de comportements en fonction des conditions d'environnement. On s'en tiendra ici à deux exemples, l'un chez les ciliés et l'autre chez les flagellés.

La nage des cellules se produit grâce à une coordination du battement des cils ou des flagelles. Le déplacement de la cellule dans une direction donnée s'accompagne souvent d'une rotation lente du corps cellulaire. C'est le cas pour la *Paramecie*, cellule ovoïde de plus de 100 microns de long qui possède plusieurs milliers de cils distribués de manière régulière en rangées longitudinales (le long de méridiens). Le battement est synchrone d'une rangée de cils à l'autre (sur un même parallèle), mais possède un léger déphasage le long d'une rangée, ce qui provoque une onde métachronale à la surface de la cellule qui se traduit par une lente rotation. La *paramecie* face à un obstacle peut modifier sa trajectoire en renversant, sous le contrôle d'un signal calcique, le battement de ses cils, ce qui a pour effet de la faire reculer. Puis le battement ciliaire s'interrompt transitoirement sur toute la surface de la cellule, sauf dans l'orifice buccal, très riche en cils et placé en position asymétrique à l'avant de la cellule. Ceci produit une rotation de l'axe du corps cellulaire. Lorsque le battement normal reprend, la direction du mouvement avant fait un angle de plusieurs dizaines de degrés avec la direction précédente. Elle possède également des réponses adaptées à de nombreux signaux de l'environnement, y compris le champ de gravité.

L'algue verte unicellulaire biflagellée *Chlamydomonas reinhardtii* se déplace vers l'avant grâce à un battement asymétrique (de type ciliaire) de ses deux flagelles, dont les bases sont orientées à 45° par rapport à l'axe du corps cellulaire, et à la direction du mouvement. Les battements des deux flagelles se produisent symétriquement par rapport au plan de symétrie de l'appareil flagellaire (figure 5). Il y a cependant un léger déphasage entre les battements des deux flagelles, ce qui entraîne là encore une lente rotation du corps cellulaire. Cette rotation lui permet d'explorer l'environnement et en particulier de localiser la source de lumière grâce à une structure photo réceptrice en position asymétrique, le stigma (ou "eye-spot" en anglais), qui peut, par le biais d'une transduction dans le plan de la membrane gouvernant un influx calcique à la base des flagelles, entraîner une modification du battement de l'un des deux flagelles seulement. Comme un rameur utilisant ses rames de manière asymétrique pour changer de direction, la cellule change ainsi sa direction et va rechercher la lumière dont elle a besoin pour sa photosynthèse. Cette algue est également capable de reculer, en particulier si elle est soumise à une lumière trop vive, grâce à un comportement particulièrement élaboré: les bases flagellaires (cinétosomes/centrioles), normalement orientées à 90° l'une par rapport à l'autre, peuvent devenir parallèles grâce à la contraction sous contrôle du calcium de petites structures qui les relient. Les deux flagelles adoptent alors un battement de type flagellaire et, en s'enroulant l'un

autour de l'autre, produisent une poussée vers l'arrière comparable à celle d'une hélice de bateau. D'autres solutions ont été sélectionnées au cours de l'évolution des algues unicellulaires pour assurer la transition entre le mouvement vers l'avant et le mouvement de recul (figure 5).

Le battement coordonné des cils entraîne des courants d'eau le long de la surface cellulaire permettant à la cellule de nager. Si la cellule était fixée, le battement entraînerait une circulation du fluide à sa surface. C'est ce qui se passe pour les épithéliums ciliés des métazoaires, comme la trachée des mammifères ou l'oviducte des oiseaux, chez lesquels le battement ciliaire assure une fonction de transport. Cet exemple montre la versatilité d'utilisation des mêmes structures au cours de l'évolution. Il existe bien d'autres exemples. Ainsi certains unicellulaires ciliés de grande taille ont une ciliature extrêmement différenciée selon les régions de leur surface. Des groupes de cils peuvent être physiquement associés entre eux, formant des cirres dont le battement est plan, et qui peuvent non seulement servir à nager mais aussi à " marcher " sur des surfaces. D'autres exemples peuvent être trouvés chez des algues unicellulaires qui utilisent leurs deux flagelles pour capturer leurs proies.

### *Les gamètes mâles des pluricellulaires*

Les cellules qui constituent le corps des animaux, lorsqu'elles se déplacent dans l'organisme ou dans une boîte de culture, le font normalement par migration sur une surface (voir plus bas). Cependant, les gamètes mâles ou spermatozoïdes doivent au moment de la fécondation, que celle-ci soit interne ou externe, réaliser des déplacements sur de grandes distances grâce à un flagelle qui peut atteindre des longueurs supérieures à 100 microns. Certains organismes végétaux, comme les fougères, ou les ginkales, possèdent également des gamètes mâles, les anthérozoïdes, équipés d'un flagelle structurellement semblable sinon identique à celui des animaux ou des unicellulaires.

## I.2. La migration sur une surface

### *Le mouvement amiboïde*

Les amibes unicellulaires se déplacent en rampant sur des supports solides. De même, lorsque certaines cellules migrent dans le corps d'un animal, durant le développement de l'embryon ou dans l'organisme adulte, elles le font en glissant ou en rampant sur la surface des autres cellules ou sur la matrice extracellulaire. Le contact avec un support est nécessaire pour fournir à la fois un point d'appui qui permette une déformation de l'avant de la cellule dans la direction du mouvement et un point d'ancrage à partir duquel l'arrière de la cellule puisse être tiré vers l'avant. Tous ces mouvements se font contre la viscosité de la couche de milieu voisine de la surface cellulaire.

Les grandes amibes d'eau douce qui peuvent atteindre 1 millimètre de diamètre se déplacent en produisant de gros pseudopodes, sortes de protrusions dans lesquelles coulent du cytoplasme. Ces protrusions prennent plusieurs minutes pour s'allonger et établissent des contacts avec le support pendant que d'autres pseudopodes se rétractent. Le terme pseudopode indique bien que le déplacement a une vague ressemblance avec la marche, mais c'est à celle de certaines chenilles qu'il faut penser. Le cytoplasme de la cellule est le siège d'un courant permanent qui permet de distinguer un endoplasme central, plus mobile et un ectoplasme plus rigide, sorte de couche corticale de cytoplasme dans lequel se trouvent la majorité des organites intracellulaires.

Dans les cellules plus petites, et en particulier dans les cellules des vertébrés, les pseudopodes participant au mouvement ont souvent une forme qui ressemble à celle d'un éventail parallèle au support, on parle alors de lamellipode, et les mouvements intracytoplasmiques sont plus complexes et peuvent être régulés. Les lamellipodes manifestent une activité permanente de formation et de rétraction qui donne l'impression d'une dentelle. Dans le même temps, ils

assemblent des points d'ancrage, ou contacts focaux plus stables, qui servent de point d'appuis à la cellule pour se déplacer vers l'avant. La cellule qui migre a ainsi souvent une forme triangulaire, avec à l'arrière une sorte de traîne qui se rétracte périodiquement. Le répertoire des différents mouvements peut varier d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi certaines cellules, en plus du lamellipode, ou à sa place, utilisent des sortes de fins prolongement rigides, ou filopodes, pour avancer. La même cellule peut d'ailleurs, selon l'environnement, utiliser un mode ou l'autre de protrusion vers l'avant, et la manière dont l'assemblage de ces édifices transitoires à base de filaments d'actine est gouverné et orienté vers un type de structure ou un autre, commence à être comprise (cf MOTILITE). Il existe en effet une combinatoire de régulations dont les éléments essentiels sont des petites protéines capables d'hydrolyser le GTP et d'agir ainsi comme des commutateurs moléculaires. Ces petites GTPases spécialisées dans la régulation des réseaux d'actine appartiennent en fait à une très grande "superfamille" de protéines participant, selon les mêmes principes, à la régulation de très nombreuses fonctions cellulaires telles que la transduction de signaux entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule ou le trafic membranaire intracellulaire. On peut d'ailleurs noter ici qu'il existe une parenté importante entre les mécanismes de la motilité et ceux de l'endocytose ou de la phagocytose. Ainsi, les amibes ont la propriété d'ingérer des proies par déformation de leur membrane, mais elle ne peuvent à la fois phagocyter une proie et se déplacer car la structure qui permet la phagocytose est un véritable pseudopode qui implique toute la cellule. On pourrait ainsi considérer la phagocytose comme un déplacement sur un support si courbé qu'il est internalisé. On peut d'ailleurs trouver cette parenté également chez les unicellulaires qui utilisent des structures à base de microtubules pour se déplacer (cils et flagelles) et chez lesquels non seulement la capture des proies mais leur ingestion reposent sur des mécanismes impliquant les microtubules.

De manière remarquable, certains unicellulaires sont capables d'utiliser des stratégies de locomotion alternatives en fonction du milieu environnant. Ainsi les amibo-flagellés, dont certains représentants sont responsables d'encéphalopathies mortelles, sont des unicellulaires qui se déplacent grâce à un mouvement amiboïde lorsqu'ils se trouvent dans un milieu riche et suffisamment dense, ou sur une surface. Dans cette situation, leur système microtubulaire est rudimentaire. Si ces cellules sont plongées dans un milieu pauvre et très liquide, de l'eau distillée par exemple, elles sont capables en moins d'une heure de se transformer en des cellules ayant une forme oblongue, sous-tendue par un appareil microtubulaire cortical très abondant organisé à partir d'un appareil flagellaire qui leur permet de nager rapidement vers un environnement plus favorable. Cette transition d'une cellule eucaryote entre les deux grands modes de locomotion, la nage et la migration sur une surface, rappelle celle de la bactérie de la listériose lorsqu'elle abandonne la nage pour pénétrer dans les cellules qu'elle infecte. Elle implique une modification du profil d'expression de très nombreux gènes pour pouvoir assembler les flagelles qui sont constitués de plus de 200 protéines différentes. Cet exemple de différenciation rapide en réponse à un environnement hostile montre que l'évolution biologique a non seulement conduit à des stratégies de locomotion très différentes, mais qu'elle a aussi sélectionné des systèmes biologiques capables pour leur survie d'utiliser les deux stratégies de manière alternative.

## II. Valeur adaptative des mouvements.

Pour posséder une valeur adaptative, le déplacement des cellules implique qu'il puisse être régulé en fonction de l'environnement. Des procédures de réponse aux stimuli de l'environnement ont été sélectionnées durant l'évolution. Ces réponses, de type sensori-moteur, gouvernent avec une troublante efficacité des tactismes de nature variée. Voir une algue verte unicellulaire, d'un diamètre de quelques microns, chercher ou fuir la lumière en fonction de l'intensité de celle-ci, grâce à un appareil bi-flagellaire dont elle peut, comme à volonté,

modifier le battement en faisant varier plusieurs paramètres tels que sa forme, son orientation ou sa symétrie, demeure même pour le spécialiste un sujet d'émerveillement. De nombreux mécanismes de rétroaction sont impliqués dans de telles réponses, qui représentent à l'échelle de la cellule l'équivalent d'une activité de type réflexe. D'une manière générale, quel que soit l'organisme considéré, de la bactérie à l'eucaryote supérieur, le schéma comportemental est toujours le même, les stimuli sont captés et intégrés - on nomme transduction cet ensemble de phénomènes qui ont pour support des réseaux biochimiques, des systèmes de filaments ou des réseaux de cellules comme dans le système nerveux centrale et qui débouchent sur une réponse appropriée.

## II.1. Signaux mécaniques, lumineux ou électriques.

### Signaux mécaniques

Les cellules animales, dont la membrane est souple, ont développé des mécanismes capables d'intégrer les champs de forces auxquels elles sont soumises. Les cellules des organismes multicellulaires sont par exemple guidées par la courbure du support, qui au delà d'une certaine valeur, semble difficilement franchissable. Ce guidage physique, dont le mécanisme n'est pas encore bien compris, pourrait également intervenir au cours du développement de l'embryon. On peut par exemple observer une réponse active lorsqu'on étire une cellule. Si l'on tire la membrane d'un neurone à l'aide d'un micromanipulateur, on peut induire la formation d'un axone. Il existe d'ailleurs une théorie du développement cérébral et plus particulièrement de la formation des circonvolutions de l'encéphale, qui donne une grande importance aux tensions qu'exercent les neurones les uns sur les autres. Dans tous les cas, les deux cibles principales des signaux mécaniques sont la membrane plasmique et le cytosquelette qui sont très étroitement liés. Ce tactisme mécanique des cellules n'est pas sans rappeler le sens du toucher au niveau de l'organisme qui, pour qu'une réponse adaptée soit produite, n'implique pas seulement les récepteurs à la pression de la peau, mais tous les muscles de la main et du bras pour juger de la résistance du matériau touché.

### Signaux lumineux et signaux électriques

La phototaxie et la galvanotaxie sont des phénomènes dont les unicellulaires fournissent de très nombreux exemples. Ils sont beaucoup moins bien connus chez les pluricellulaires, mais il y a cependant de nombreux exemples de galvanotaxie des cellules animales, comme les neurones, qui sont capables de détecter des champs électriques très faibles (jusqu'à 0,1V/cm), ou les cellules de la peau. Certaines cellules peuvent même répondre à des champs électriques trop faibles pour provoquer des perturbations des flux ioniques transmembranaires qui sont généralement la cible des signaux électriques. Le mécanisme de ces réponses n'est pas bien compris et l'on ne sait pas si cela a une importance physiologique. L'exemple de phototaxie le mieux étudié est celui de l'algue unicellulaire biflagellée *Chlamydomonas reinhardtii*, que nous avons brièvement décrit précédemment. Ce qui est remarquable dans cette réponse phototactique, qui peut devenir photophobique si l'intensité lumineuse est trop forte, c'est qu'elle est due à un organite photosensible spécialisé, le stigma, qui est en fait une spécialisation locale de la membrane du chloroplaste au voisinage de la membrane plasmique. Cet organite a d'étonnantes propriétés: il peut polariser la lumière et, comme l'oeil des vertébrés, utilise la trans-conformation du rétinol sous l'effet de la lumière.

## II.2. Signaux chimiques : la chimiotaxie

La chimiotaxie est le tactisme le mieux compris, car on peut par manipulation génétique

découvrir peu à peu les protéines impliquées dans la transmission du signal : le principe est la liaison d'une molécule du milieu extracellulaire, une hormone ou un facteur de croissance par exemple, à un complexe protéique transmembranaire capable de la reconnaître. La liaison de la molécule-ligand à la partie extracellulaire du récepteur entraîne un changement de conformation dans son domaine transmembranaire (entraînant par exemple l'ouverture d'un canal ionique qui permettra de changer le potentiel de membrane, comme dans les synapses) ou intra-cellulaire, ce qui déclenche diverses réactions biochimiques comportant une amplification du signal et des boucles de rétroaction (comme dans un amplificateur opérationnel). Certaines hormones sont capables de traverser la membrane et ne rencontrent leur récepteur qu'une fois entrées dans la cellule. Toutes ces réactions ont pour conséquence finale l'asservissement de la motilité à des contraintes extérieures. Les bactéries et tous les êtres unicellulaires doués de motilité s'en servent pour trouver leur nourriture. Dans les organismes pluricellulaires, certains types de cellules sont douées de chimiotaxie. C'est le cas en particulier des leucocytes neutrophiles qui phagocytent les cellules mortes ou les bactéries. On peut étudier quantitativement la réponse chimiotactique des neutrophiles à des molécules émises par les bactéries pour lesquelles ils possèdent des récepteurs à leur surface. Les cellules peuvent détecter des différences d'un facteur dix entre les concentrations de chimio-attractant de chaque côté de leur corps. De plus la cellule est capable de répondre dans des gammes de concentration absolue très différentes, grâce à un mécanisme d'adaptation que l'on observe souvent dans les réponses biologiques. Ce tactisme est très semblable à l'odorat : on détecte un gradient d'une certaine molécule qui diffuse dans le milieu qui nous entoure et qui nous repousse ou nous attire. Lorsque la concentration ne varie plus, notre odorat est désensibilisé et l'on ne "sent" plus.

La chimiotaxie implique que la cellule se dirige vers les zones les plus riches en certaines molécules ou qu'elle fuit les zones riches en d'autres molécules. Cela signifie que la cellule est sensible aux gradients de concentration de ces molécules. Or, compte tenu de la diffusion rapide des chimioattractants, qui sont des petites molécules, les gradients ne peuvent s'établir durablement qu'au delà de certaines distances. Ainsi, les cellules eucaryotes d'une taille dépassant souvent la dizaine de microns (les cellules les plus douées pour la chimiotaxie sont souvent plus grandes encore), peuvent, contrairement à des bactéries, sentir un gradient entre l'une et l'autre de leurs extrémités et donc connaître sans se déplacer la direction à prendre. Un macrophage près duquel meurt une autre cellule se polarise dans la direction de la cellule morte puis se dirige vers elle. Un exemple classique de chimiotactisme est fourni par les amibes grégaires, ou myxamibes, telles que *Dictyostelium discoideum*. Ces petites amibes sont très individualistes lorsqu'elles se trouvent dans un milieu riche. Si l'appauvrissement du milieu menace leur survie, elles optent pour un comportement collectif et s'appellent mutuellement en émettant de manière périodique une petite molécule, l'AMP cyclique, pour laquelle elles possèdent aussi des récepteurs. Elles peuvent ainsi faire varier en permanence la direction de leur migration en fonction des gradients produits localement par leurs voisines, conduisant à un rassemblement spectaculaire de cohortes successives de cellules s'organisant en spirales autour d'un ou de plusieurs centres. Cette agrégation est un modèle de structuration pour les théoriciens. Il est aussi sur le plan biologique un remarquable exemple de stratégie de survie : une fois agrégées, les cellules forment un pseudo organisme capable, tel un essaim d'abeilles, de migrer comme un tout, en développant un avant et un arrière, et finalement de produire une fructification au bout de laquelle un sporange abritera la formation de spores qui pourront attendre des conditions de milieu plus favorables.

#### *La chimiotaxie bactérienne.*

En raison de leur petite taille, les bactéries ne peuvent détecter une différence de concentration (de nourriture, ou de poison) entre leur deux extrémités. Elles doivent donc se déplacer et mesurer le gradient au cours de leur déplacement. Cependant, même si elles rencontrent et perçoivent un gradient positif, cela ne signifie pas forcément qu'elles vont dans la direction du

gradient le plus fort, qui permettrait d'aller au plus vite vers la source de nourriture. La stratégie sélectionnée au cours de l'évolution est un mouvement en zigzag: la bactérie se déplace en ligne droite puis tourne sur elle-même et repart dans une autre direction. Mais elle ne connaît le milieu que dans la direction qu'elle suit. Elle ne peut donc choisir la nouvelle direction qu'au hasard. Comment fait-elle alors pour se diriger vers la source? En faisant varier la durée de son déplacement rectiligne selon le signe et l'amplitude du gradient qu'elle mesure au cours de ce déplacement: plus le gradient est positif, plus elle retarde le changement de direction; au contraire, s'il est négatif, la bactérie tournera au plus vite. On voit que cela lui permet non seulement de trouver les sources de nourriture, mais en plus d'y rester (si elle s'en éloigne, le gradient négatif entraînera un changement de direction rapide).

Le réseau biochimique qui est à l'origine du comportement particulier de la bactérie est connu. Une modélisation informatique de ce réseau a permis d'en découvrir une propriété fondamentale: si l'on change au hasard, sur un ou deux ordres de grandeur, les paramètres, par exemple les constantes de réaction, on n'altère pas la capacité à remonter le gradient. Seul le temps de réaction au gradient change. La chimiotaxie bactérienne n'est donc pas la conséquence d'une régulation fine des interactions entre protéines, mais résulte de l'architecture même du réseau biochimique. Il a pu être montré que cette propriété peut être attribuée à une sorte de 'réseau minimal' impliquant une boucle de rétroaction, et un changement de conformation entre deux états d'une protéine (soit par réaction allostérique, soit par modification covalente).

Cette propriété de stabilité, ou robustesse, du réseau biochimique, qui pourrait être généralisable à de nombreux réseaux métaboliques dans la cellule, a probablement une valeur évolutive: des propriétés essentielles de réseaux biochimiques seraient stables en dépit de mutations dans les molécules impliquées, tandis que d'autres pourraient évoluer. Ainsi, de manière schématique, les bactéries peuvent garder leur capacité à remonter les gradients de nourriture vers leur source malgré des mutations dans les composants du réseau, mais ces mutations qui n'affectent que le temps de réponse au gradient, pourront permettre l'apparition de bactéries plus rapides qui seront sélectionnées (elle trouveront plus vite les sources de nourriture et seront les premières à en bénéficier).

### III. Physio-pathologie du mouvement cellulaire dans les organismes multicellulaires

Les mécanismes moléculaires du mouvement cellulaire ont été élaborés et sélectionnés pendant la longue évolution des eucaryotes à l'état unicellulaire, soit pendant près de 2,5 milliards d'années. Lorsque les eucaryotes multicellulaires sont apparus, il y a seulement 700 millions d'années, ces mécanismes ont été exploités pour constituer des organismes tels que le corps humain qui contient plus de 10 000 milliards de cellules.

Dans les tissus de l'organisme adulte des métazoaires, les cellules ne se déplacent pas et l'essentiel de leurs mouvements concerne les mouvements intracellulaires, tout comme chez les métaphytes. Notons cependant que contrairement aux cellules des plantes, la plupart de cellules des tissus animaux, lorsqu'elles sont dissociées et maintenues en culture, sont capables de locomotion, même si les performances sont très variables selon l'origine tissulaire des cellules.

Il existe de plus de nombreuses cellules capables de se déplacer dans l'organisme adulte, et cette capacité est d'une grande importance physiologique. Il s'agit d'abord des cellules du sang, et en particulier de toutes les cellules des lignées blanches qui participent à la défense immunitaire de l'organisme et à sa protection contre les infections ainsi qu'à l'élimination des cellules mortes. Toutes les cellules sanguines proviennent de cellules souches dans la moelle osseuse et colonisent tout en se différenciant de nombreux tissus lymphoïdes. Elles sont capables de traverser des barrières endothéliales et pour certaines de se déplacer dans des capillaires sanguins très étroits en roulant sur elles-mêmes, grâce à une adhésion transitoire avec les cellules des capillaires. D'autres, telles les macrophages ou les cellules neutrophiles, sont capables de migrer très rapidement vers un point d'infection, une blessure ou une cellule morte. Les cellules

fibroblastiques du tissu conjonctif qui soutient les organes constituent l'autre grand type de cellules capables de locomotion. Leurs fonctions sont multiples (réparer les lésions par exemple).

Mais c'est pendant le développement de l'embryon que les migrations cellulaires sont les plus importantes. On comprend facilement que les processus morphogénétiques ne peuvent se limiter à la croissance des tissus par division des cellules à partir de l'œuf, mais imposent aussi de très importants remaniements des cellules. Ainsi la gastrulation est une étape du développement que l'on rencontre chez tous les animaux. C'est le moment où l'embryon passe d'une organisation simple, le plus souvent sphérique, à la mise en place de l'organisation générale du corps. A travers des mouvements complexes des feuillet cellulaires, qui glissent les uns sur les autres, la mise en place des grands types de tissus est déterminée. Cela implique des mouvements très importants des cellules, qui se produisent de manière concertée. Ainsi le tube digestif se constitue en fait avec des cellules d'origine ectodermique qui se trouvaient à la surface externe de l'embryon avant la gastrulation. La neurulation qui se produit immédiatement après la gastrulation est un autre exemple de mouvements collectifs qui conduisent à la transformation d'un feuillet cellulaire plat en un tube creux.

A ces mouvements concertés s'ajoute la migration de cellules individuelles ayant des destinations lointaines mais précises où elles feront souche. Les cellules sont guidées par le substrat, et d'abord par la nature chimique du substrat, et cet aspect a aussi une grande importance physiologique. L'adhésion des cellules au substrat est gouvernée par des interactions moléculaires qui sont aujourd'hui assez bien connues. Les propriétés d'adhésion des cellules gouvernent les grands mouvements morphogénétiques dans l'embryon en développement. La migration des cellules de la crête neurale par exemple, qui est à l'origine de nombreux tissus, suit des voies de matrice extracellulaire riche en collagène et en protéines associées comme la fibronectine. Ces comportements peuvent être reproduits dans des conditions de culture cellulaire. La croissance des neurones au cours de la mise en place du système nerveux est un autre exemple particulièrement étudié dans la mesure où les cellules doivent, à travers un cheminement long et compliqué de leur axone, établir des connections à grande distance, entre le système nerveux central et le système nerveux périphérique ou les muscles. Dans ces cellules très spécialisées, la structure motile, ou cône de croissance, se trouve à l'extrémité de l'axone et migre à l'aide de lamellipodes et de filopodes. Il semble exister un système de guidage subtil, impliquant des mécanismes de choix très sélectifs incluant des mécanismes d'inhibition provoquant la rétraction du cône de croissance si celui-ci se dirige dans une mauvaise direction. Les molécules impliquées dans cette signalisation sont activement recherchées.

S'il est indispensable au développement de l'organisme et à son intégrité, le mouvement des cellules individuelles, quand il est dérégulé, peut constituer une grave menace. Il existe en effet un couplage entre l'adhésion des cellules, entre elles ou à une matrice extracellulaire lors de leur migration, et leur croissance par division. On observe par exemple, lorsque des cellules fibroblastiques sont mises en culture, une inhibition de migration par contact entre cellules qui s'accompagne d'une inhibition de croissance et de prolifération. L'un des critères de définition de la transformation cancéreuse pour des cellules normalement adhérentes est la perte de ce couplage: les cellules continuent de proliférer lorsqu'elles sont au contact, migrant les unes sur les autres en formant des amas, ou lorsqu'on les cultive dans des conditions qui empêchent leur ancrage, conditions qui interdisent la croissance des cellules normales. Cette dérégulation caractérise l'état métastatique des tumeurs: les cellules ne savent plus qu'elles appartiennent à un tissu particulier et migrent à travers les barrières tissulaires tout en proliférant, menaçant la survie de l'organisme tout entier.





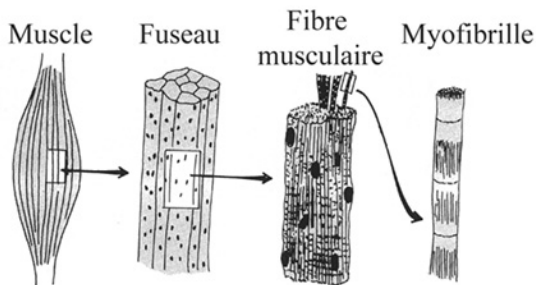
# Figure 1

## Du moteur moléculaire à la course du guépard : changement d'échelle et coordination

Guépard



1 m  
30 m/s

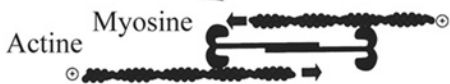


1-10 cm  
1 m/s

Sarcomère



2  $\mu$ m  
1 mm/s

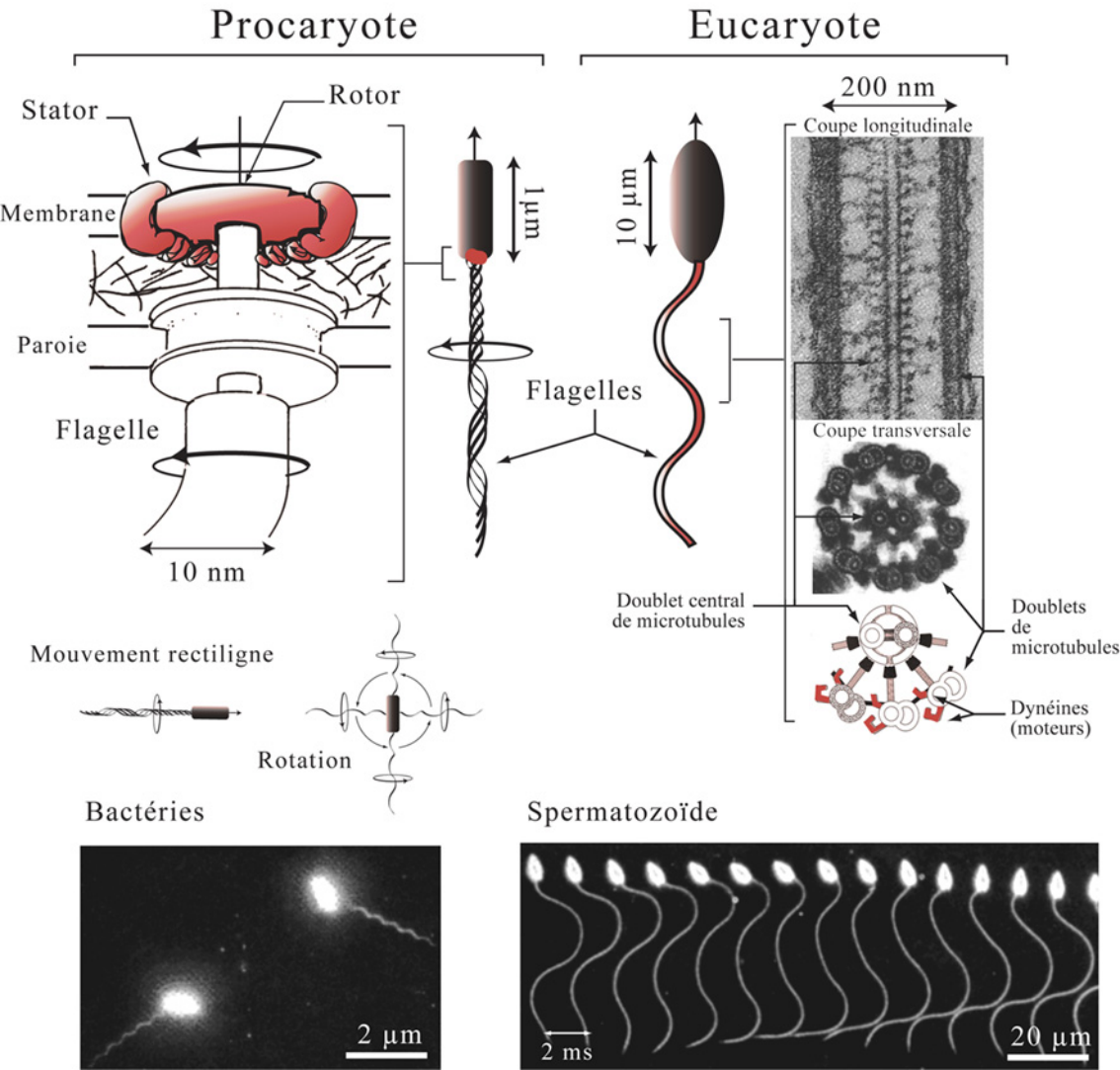


10-100 nm  
1  $\mu$ m/s



# Figure 2

## La nage

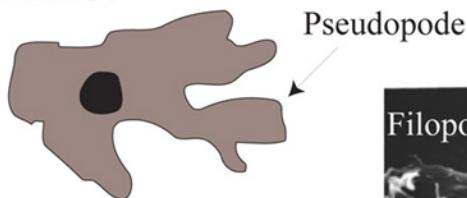




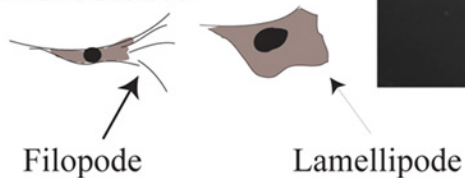
# Figure 3

## Le mouvement amiboïde

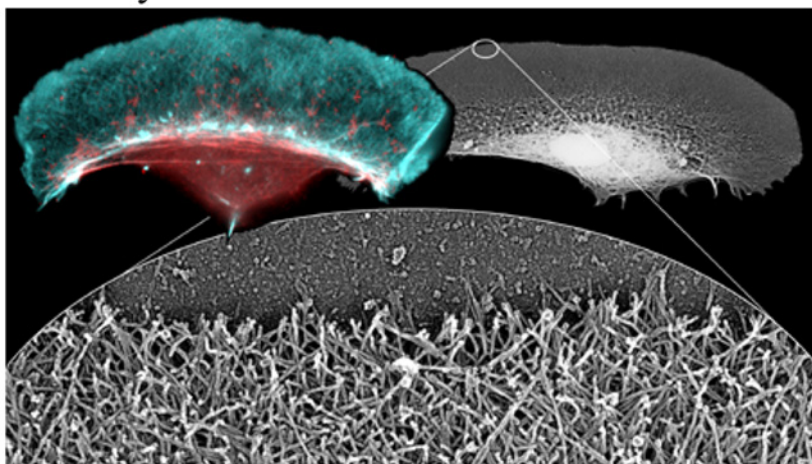
Amibe



Fibroblaste



Kératocyte





# Figure 4

## Chimiotactismes

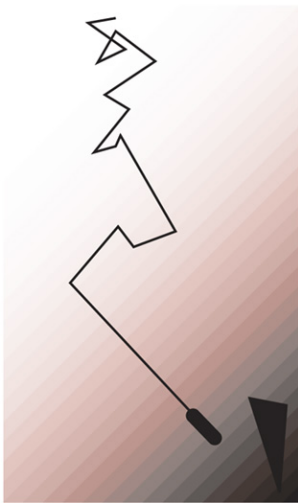
Procaryotes

Eucaryotes

Concentration d'attractant uniforme



Gradient



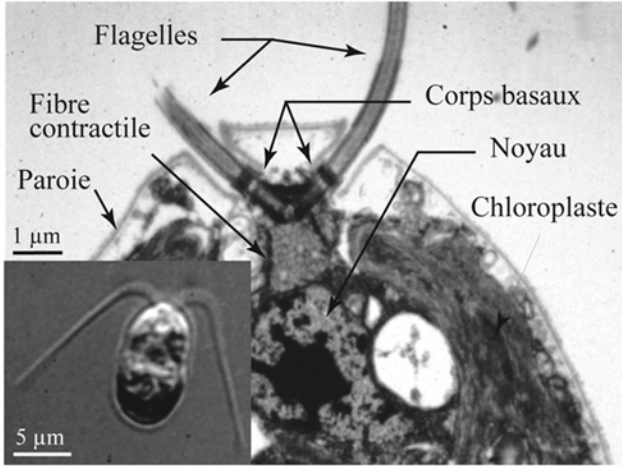




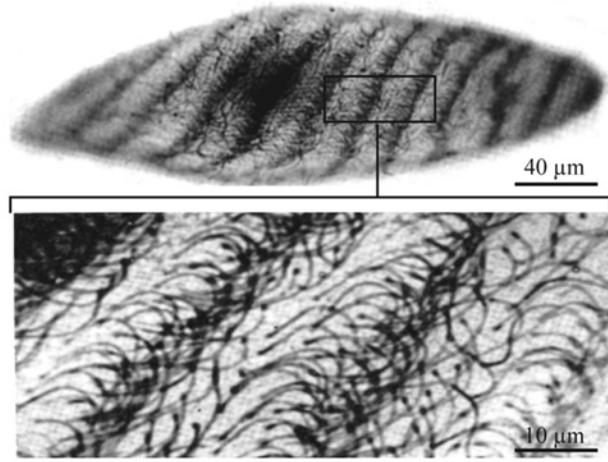
# FIG 5

## Ciliés et Flagellés

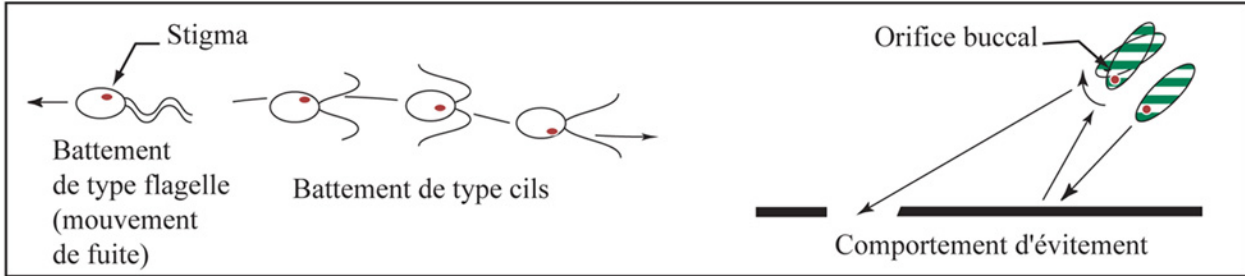
### *Chlamydomonas Reinhardtii* (algue unicellulaire)



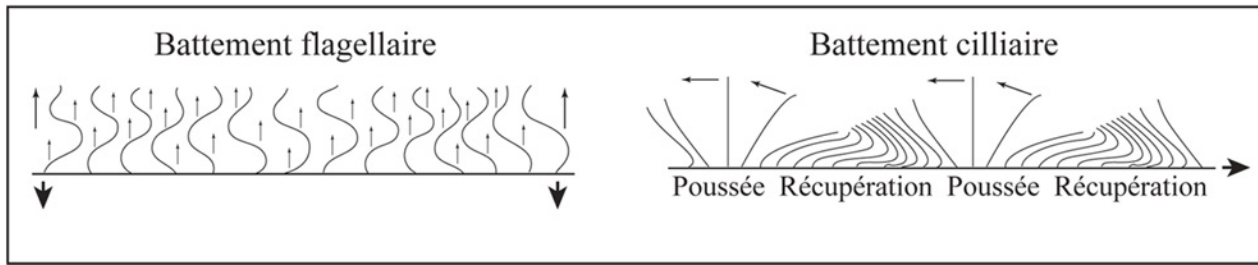
### *Paramecium* (cilié)



### Comportements



### Battements





## MOTILITE

Les mouvements dans le vivant peuvent être décrits à une échelle macroscopique, leur coût énergétique se calcule alors en terme de travail d'une force sur une distance. Un des enjeux est de comprendre quelles sont les sources d'énergie utilisées par les êtres vivants pour produire des forces et comment cette énergie est convertie en travail mécanique. Cet article s'attache à décrire ce processus de conversion. Les sources primaires peuvent varier (eau, gaz carbonique et lumière pour la photosynthèse, oxygène et composés organiques pour la respiration cellulaire, et quelques systèmes d'utilisation plus exotique fondés néanmoins sur les mêmes principes), mais finalement l'énergie est toujours stockée sous forme d'une liaison entre deux phosphates, dans une molécule d'ATP (adénosine triphosphate) ou de GTP (guanosine triphosphate). Cette énergie pourra être utilisée ensuite par des protéines (les ATPases ou GTPases) capables d'hydrolyser cette liaison. Dans le mouvement, l'énergie sert à la fois à la construction des structures nécessaires à la production de forces, à la production de la force elle-même et à la régulation du phénomène. L'utilisation par certains complexes protéiques de l'ATP ou du GTP pour produire une force est appelée transformation mécano-chimique. Il existe principalement deux types de complexes protéiques capables d'effectuer cette transformation : le premier correspond chez les eucaryotes au module polymère polarisé/moteur moléculaire et le second chez les procaryotes au couple rotor/stator du moteur flagellaire. On décrira successivement les structures protéiques motiles des eucaryotes et les différents mécanismes de production de force.

### I. Les molécules du mouvement chez les eucaryotes

#### I.1. Les polymères du cytosquelette

Les polymères protéiques des trois réseaux du cytosquelette sont de deux types. Le premier concerne les microtubules et les microfilaments qui sont assemblés à partir d'une sous-unité globulaire, selon un mécanisme qui consomme de l'énergie et qui confère aux polymères une polarité structurale. Cette propriété est essentielle pour leurs fonctions. Elle gouverne également une polarité cinétique, les deux extrémités du polymère ayant des vitesses nettes d'assemblage différentes. On sait aujourd'hui que ces polymères, plutôt qu'en équilibre avec leurs sous-unités monomériques comme on l'avait longtemps cru, sont en fait à l'état stationnaire instables. Cette propriété fait des réseaux microtubulaires et microfilamentaire des systèmes très dynamiques et adaptables. Le second type correspond aux filaments intermédiaires dont l'assemblage se fait à partir de protéines fibreuses très insolubles dans les conditions physiologiques, selon un mécanisme qui ne consomme pas d'énergie. Ces polymères, qui ne sont observés ni chez les unicellulaires ni chez les plantes, sont moins dynamiques que les deux autres, n'ont pas d'activité catalytique connue, et l'on considère qu'ils possèdent un rôle structural, apportant la résistance nécessaire à certains tissus comme la peau et le muscle, ou permettant aux cellules de maintenir le volume nécessaire aux mouvements intracellulaires. Ils peuvent interagir, via des protéines particulières, aussi bien avec les microfilaments d'actine qu'avec les microtubules le long desquels ils peuvent être transportés. Ils forment une sorte de matrice réticulante élastique dont on ne sait pas encore évaluer le rôle dans le mouvement cellulaire ; ils ne seront pas décrits plus avant ici.

#### *Les microfilaments*

L'actine, d'abord isolée des muscles dont on a longtemps cru qu'elle en était la marque moléculaire distinctive, est une protéine ubiquitaire parmi les plus abondantes dans la plupart des cellules eucaryotes. Le monomère d'actine, ou actine G (pour globulaire), est une protéine formée d'un seul polypeptide de poids moléculaire voisin de 42 000 daltons. Chaque molécule porte associée à elle une molécule d'ATP ou d'ADP (adénosine diphosphate, forme hydrolysée de l'ATP). On observe une grande conservation de la séquence en acides aminés de cette protéine au cours de l'Évolution. Il faut cependant souligner que, chez les organismes supérieurs, il existe en fait plusieurs isoformes d'actine. On peut distinguer au niveau moléculaire une actine spécifique des muscles squelettiques, du muscle cardiaque, des muscles lisses, des tissus non musculaires, mais leurs propriétés sont très semblables et ces différentes isoformes peuvent co-assembler.

Les monomères d'actine G s'associent spontanément et facilement en un filament hélicoïdal correspondant à une double hélice de monomères, dont le diamètre est de l'ordre de 6 nm. Ces filaments flexibles, qui peuvent mesurer plusieurs microns, ont une polarité structurale due au mode d'assemblage à l'identique des monomères d'actine G qui sont eux-mêmes asymétriques. Cette polarité structurale peut être mise en évidence et facilement observée au microscope électronique, en utilisant certains artifices. La polymérisation dépend de nombreux paramètres physico-chimiques qui gouvernent la solidité des associations latérales entre les différents monomères. L'hydrolyse de l'ATP lié à chaque monomère d'actine influence grandement la vitesse de polymérisation (voir mécanismes d'assemblage). On peut étudier la polymérisation de l'actine par des méthodes physiques comme la mesure de la variation de viscosité, de la diffusion de la lumière ou par des méthodes spectroscopiques plus sensibles. On connaît des drogues, souvent des produits naturels extraits de champignons, qui sont capables de grandement faciliter, ou au contraire, d'empêcher la polymérisation de l'actine en microfilaments.

### *Les microtubules.*

La tubuline, isolée de la fraction soluble d'extraits de cerveau de porc ou de bovin, a un poids moléculaire de 110 000 daltons. C'est en fait un hétéro-dimère, formé de l'association non covalente de deux isoformes différentes de tubuline, la tubuline  $\alpha$  et la tubuline  $\beta$ , chacune ayant un poids moléculaire de 55 000 daltons. La synthèse de ces deux isoformes est gouvernée par des gènes différents. Chaque molécule de tubuline  $\alpha$  possède associée à elle une molécule de GTP et chaque molécule de tubuline  $\beta$  possède associée à elle une molécule de GTP ou de GDP. L'hydrolyse du GTP en GDP par la sous-unité  $\beta$  joue un rôle très important pour réguler la polymérisation des microtubules (voir mécanismes d'assemblage).

Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , comme l'actine, sont des protéines très conservées au cours de l'Évolution. Mais comme pour l'actine, il existe une famille de gènes de tubuline  $\alpha$  ou  $\beta$ , et des expressions différentielles de certaines isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  selon les tissus, dont la véritable signification fonctionnelle n'est pas comprise. Toutes les isoformes peuvent co-polymériser. Une autre dimension de régulation possible des propriétés des tubulines provient de nombreuses modifications chimiques covalentes post-traductionnelles, c'est-à-dire des modifications qui interviennent après la synthèse de la protéine. Là encore la signification fonctionnelle de ces modifications ne semble pas porter sur les propriétés de polymérisation de la tubuline.

L'auto-assemblage de la tubuline en microtubules n'a été obtenu que dans les années 70. Il a fallu pour cela réaliser que les ions  $\text{Ca}^{++}$  devaient être absents ou à très basse concentration dans le milieu et que le nucléotide GTP, et non l'ATP, était nécessaire. Une transition de température de 4°C vers 30 à 37 °C pendant 15 à 30 min en présence de GTP permet à une

solution suffisamment concentrée de tubuline d'assembler en polymères rectilignes tubulaires, rigides, d'un diamètre de 25 nm, dont les parois sont constituées de 13 à 14 protofilaments linéaires associés longitudinalement, eux-mêmes formés d'un enchaînement à l'identique de dimères  $\alpha/\beta$ . Ce mode d'assemblage conduit, comme pour le microfilament d'actine, à un polymère possédant une polarité structurale, une extrémité exposant les sous-unités  $\alpha$ , l'autre les sous-unités  $\beta$ . Si la suspension est refroidie de nouveau à 4°C, les microtubules dépolymérisent très rapidement. Cet effet de la température s'explique, sur le plan thermodynamique, par le fait que les liaisons entre les sous-unités sont essentiellement hydrophobes. À température constante suffisamment élevée pour que les microtubules puissent se former, l'hydrolyse du GTP associé à la sous-unité  $\beta$  joue un rôle essentiel dans la stabilité des microtubules (voir plus bas).

## I.2. Les mécanismes d'assemblage, la dynamique des polymères et leur régulation, la réaction de nucléation

Les microfilaments et les microtubules sont des polymères protéiques très différents, mais les principes biochimiques qui gouvernent leur assemblage et leur stabilité sont semblables (figure 1). Dans l'un et l'autre cas, l'hydrolyse du nucléotide associé aux sous-unités peut entraîner une transition entre un polymère apparemment stable en train de croître et un polymère instable, qui peut se désassembler très rapidement. Il a fallu de nombreuses années pour que la signification de l'hydrolyse du nucléotide qui accompagne la polymérisation soit comprise. Il reste encore aujourd'hui certains points à éclaircir. L'idée la plus admise est que l'hydrolyse du nucléotide dans les sous-unités polymérisées se fait de manière vectorielle (sous sa forme polymérisée, l'actine devient une ATPase efficace capable d'hydrolyser l'ATP qui lui est associé, de même que le dimère de tubuline devient une GTPase efficace capable d'hydrolyser le GTP qui est associé à la sous-unité  $\beta$ ). Tant qu'existent aux extrémités du polymère des coiffes de sous-unités n'ayant pas encore hydrolysé le nucléotide associé, le polymère est stable (en raison de la conformation particulière de ces sous-unités). Lorsque l'ensemble du polymère est fait de sous-unités ayant hydrolysé le nucléotide associé, il devient instable. On comprend que la probabilité que cette transition se produise dépende du rapport de la vitesse de polymérisation, qui est proportionnelle à la concentration en monomères, à celle de l'hydrolyse du nucléotide. Ce rapport va évoluer avec l'appauvrissement du milieu en monomères au cours de la polymérisation. Ainsi la probabilité pour qu'un polymère individuel devienne soudainement instable va augmenter en même temps que la vitesse de croissance des polymères diminue.

Quel que soit le modèle, l'un des aspects les plus importants de la vision actuelle de la stabilité de ces polymères est qu'il s'agit d'un état stationnaire, qui recouvre en fait une importante dynamique d'association et de dissociation des sous-unités dans les polymères. Ceux-ci sont en fait constitutivement instables. Sans une consommation permanente d'énergie, apportée par l'hydrolyse du nucléotide, ou des mécanismes extrinsèques de stabilisation, par exemple la liaison de protéines stabilisatrices sur leur paroi (voir protéines associées), les polymères se désassemblent. L'autre aspect important est que la vitesse nette d'association des sous-unités dans le polymère n'est pas la même aux deux extrémités du polymère, qui sont structurellement différentes. Cette polarité cinétique, qui permet de distinguer une extrémité dite (+) d'une extrémité dite (-), est l'un des principes fondamentaux de l'organisation des réseaux de microfilaments et de microtubules dans la cellule. Enfin, un dernier aspect doit être souligné: le rôle de l'hydrolyse du nucléotide, qui se produit dans le corps du polymère, sur la stabilité des polymères confère à chaque polymère individuel un comportement qui peut être différent de celui du polymère voisin à un moment donné. Même

s'il existe des régulations cellulaires capables d'imposer un changement collectif de la dynamique moyenne des polymères, par exemple au moment de la transition entre l'interphase et la mitose, chaque polymère individuel montre des transitions aléatoires entre des phases de croissance et des phases de décroissance. Les observations *in vivo* de plus en plus précises montrent en fait tout un répertoire de comportement. On peut par exemple observer dans certaines conditions, un assemblage net à une extrémité compensée par un désassemblage net à l'autre extrémité, faisant du polymère une sorte de tapis roulant. Dans la même cellule, on pourra observer un comportement individuel tel que le prédit le modèle de l'instabilité dynamique, avec des transitions plus ou moins fréquentes entre croissance et décroissance de l'extrémité la plus dynamique, l'autre extrémité étant stable en raison de son association avec une protéine particulière. On observe également fréquemment dans les cellules des cassures de polymères, par exemple des microtubules. Le comportement individuel des nouvelles extrémités (+) et (-) créées par les cassures suggère clairement l'existence de mécanismes supplémentaires de stabilisation plus ou moins transitoire des extrémités des polymères.

On peut alors se demander pourquoi des mécanismes d'assemblage aussi complexes, et aussi coûteux en énergie, ont été sélectionnés durant l'Evolution biologique. La réponse tient certainement à la plasticité et à l'adaptabilité que permettent ces mécanismes. La cellule peut rapidement réorganiser son architecture en réponse à des variations du milieu environnant, ou encore réaliser certaines étapes de son cycle végétatif, comme la division par exemple, qui nécessite des transitions importantes et séquentielles de l'organisation des réseaux de microtubules et de microfilaments. Le pouvoir morphogénétique que procurent de tels mécanismes, grâce à la très grande souplesse d'utilisation de ces réseaux, a certainement joué aussi un rôle important dans la création de nouvelles formes au cours de l'Evolution.

Un aspect très important et encore mal compris de l'assemblage des microfilaments et des microtubules est l'étape de nucléation. Pour pouvoir s'allonger rapidement, un microfilament ou un microtubule a besoin, comme lors d'une cristallisation inorganique, d'un « nucleus » ou d'une amorce. Cette étape est souvent cinétiquement limitante. Lorsque l'on déclenche la polymérisation de l'actine ou de la tubuline *in vitro*, en prenant soin d'établir une concentration en monomères supérieure à la concentration critique au-dessous de laquelle on ne peut obtenir de polymérisation, on observe néanmoins une phase d'attente, de quelques minutes, pendant laquelle aucun polymère ne se forme. Si l'on ajoute des amorces préformées, par exemple des polymères cassés par sonication en petits fragments, cette étape est supprimée. La taille minimum du nucleus peut être prédite théoriquement. On a longtemps cru que dans la cellule, les sites de nucléation, le centrosome pour les microtubules par exemple, ou la membrane plasmique pour les microfilaments, contenaient des amorces préformées, ou avaient des mécanismes permettant d'abaisser localement la concentration critique de formation d'un nucleus, ou de concentrer localement les monomères. On sait aujourd'hui qu'ont été sélectionnées durant l'Evolution des protéines spécialisées dans la réaction de nucléation ou de stabilisation des extrémités (-) des polymères. Les mécanismes précis ne sont pas encore compris, mais impliquent le plus souvent un complexe protéique contenant plusieurs espèces moléculaires différentes. Dans le cas des microtubules, la protéine qui est au cœur du complexe de nucléation appartient elle-même à la famille des tubulines. Elle est le produit d'un gène qui est cependant trop divergent à la fois des gènes de tubuline  $\alpha$  et des gènes de tubuline  $\beta$  pour ne pas définir une nouvelle sous-famille, celle des tubulines. La tubuline  $\gamma$  est conservée dans l'Evolution, de même que plusieurs protéines capables de se lier à elle dans le complexe de nucléation. Plusieurs protéines candidates pour participer à la nucléation des microfilaments d'actine ont été récemment découvertes et là encore, on trouve pour certaines une évidente parenté avec l'actine. Le complexe de protéines qui régule la

nucléation des microfilaments a récemment été identifié et son action peut être reconstituée *in vitro*.

### I.3. Les protéines associées

Il existe dans les cellules des protéines capables de grandement moduler les propriétés des filaments. Un grand nombre de ces protéines ont été identifiées dans le cas des microfilaments d'actine. Elles constituent des catégories distinctes par les effets qu'elles produisent sur le système actine. Elles peuvent selon les cas, séquestrer les monomères sous une forme impropre à la polymérisation, créer des sites de nucléation, modifier la rigidité des filaments, fragmenter les filaments, les stabiliser aux extrémités, ponter les filaments et produire un gel, ou encore faciliter la formation de faisceaux de filaments parallèles.

Des protéines associées aux microtubules sont également connues, en particulier dans le cerveau, qui est très riche en microtubules stables. Ces protéines sont surtout considérées encore aujourd'hui comme des protéines de stabilisation, imposant aux microtubules une dynamique très lente. Il en existe plusieurs familles, et les mécanismes par lesquels elles agissent pourraient être variés. Il existe aussi des protéines déstabilisatrices des microtubules, dont certaines ont par ailleurs la structure de moteurs moléculaires. Ce dernier point soulève la possibilité remarquable qu'un moteur se dirigeant vers l'extrémité (+) d'un microtubule, soit capable lorsque cette extrémité est atteinte, de rester associé au bout du microtubule tout en favorisant son désassemblage. Des protéines capables de fragmenter les microtubules existent également.

On peut donc imaginer facilement l'extraordinaire plasticité que toutes ces activités sont capables d'ajouter aux propriétés dynamiques intrinsèques des polymères. Certaines de ces protéines peuvent par ailleurs participer à la mise en place de structures cellulaires spécialisées beaucoup plus stables, comme les microvillosités de la bordure en brosse intestinale constituées de faisceaux de filaments d'actine, ou comme les cils et les flagelles formés de microtubules particulièrement stables.

### I.4. Les moteurs moléculaires : les différentes familles.

Les ATPases impliquées dans la transformation mécano-chimique sont aujourd'hui regroupées sous le terme générique de moteurs moléculaires. Ces moteurs, qui sont le plus souvent eux-mêmes des oligomères de plusieurs protéines, appartiennent à plusieurs familles de molécules qui ont progressivement divergé au cours de l'évolution. Pendant longtemps, deux ATPases mécano-chimiques seulement étaient connues, et considérées comme spécifiques de structures spécialisées dans la production de mouvement. La plus anciennement caractérisée était la myosine, responsable, par son interaction avec les microfilaments d'actine, de la contraction musculaire. L'autre était la dynéine, responsable, par son interaction avec les doublets microtubulaires, du battement ciliaire ou flagellaire. Aujourd'hui, ces deux moteurs moléculaires apparaissent comme les représentants de deux super-familles de protéines, rassemblant des familles de moteurs en nombre croissant et présents dans de très nombreux compartiments cellulaires. Il existe de plus une troisième famille de moteurs moléculaires, les kinésines, insoupçonnée jusque dans les années 80, dont l'activité dépend d'une interaction avec les microtubules.

Un aspect remarquable des moteurs moléculaires est qu'ils possèdent souvent une structure analogue, même si les séquences primaires en acides aminés des différents composants sont très divergentes.



La partie motrice (capable d'hydrolyser l'ATP) est portée par une très grosse protéine (dite chaîne lourde), souvent en paire, dans laquelle on peut distinguer plusieurs domaines structuraux: la tête qui interagit avec le filament, la tige rigide, et la queue qui peut interagir avec d'autres protéines (portées par exemple par les vésicules qui sont transportées). On peut observer directement, par microscopie électronique, après un traitement qui renforce le contraste, les domaines d'une chaîne lourde isolée. Des protéines plus petites (dites chaînes légères), en nombre variable, participent à la composition du moteur et assurent le plus souvent un rôle régulateur. Il est en effet essentiel de pouvoir 'mettre en route' ou 'arrêter' chaque moteur individuellement, en fonction de signaux cellulaires.

### *La super-famille des myosines*

Une expérience d'inactivation du gène codant la seule myosine connue à l'époque fut réalisée dans les années 80 chez une amibe. Cette expérience démontra que les cellules conservaient une locomotion active. Seul l'aspect directionnel était perturbé. Ce résultat suggérait l'existence d'autres types de moteurs capables d'interagir avec les microfilaments d'actine. Depuis, la famille des myosines s'est considérablement diversifiée. Il existe aujourd'hui plus de 13 classes différentes de myosine. Les liens phylogénétiques entre ces différents moteurs (le scénario de leur apparition au cours de l'Evolution biologique) peuvent être estimés grâce à des méthodes de comparaison fine des séquences primaires, moyennant quelques hypothèses sur les vitesses d'évolution des séquences. L'arbre évolutif des chaînes lourdes de myosines, dont la structure est indiquée schématiquement, est représenté sur la figure 2. Il faut imaginer que chaque classe de myosine représente une adaptation structurale à un type de mouvement ou de transport. Les structures à l'échelle atomique (les positions réciproques de plusieurs milliers d'atomes) de ces grosses molécules sont activement étudiées et leur comparaison devrait apporter des données indispensables pour comprendre les variations dans les performances de ces différentes classes de myosine.

### *La super-famille des kinesines*

La première kinésine a été découverte beaucoup plus récemment dans le cadre de l'étude du transport axonal dans les neurones. Ces cellules propagent l'influx nerveux le long des axones, prolongements spécialisés pouvant atteindre 1m de long (dans le cas des neurones du nerf sciatique). Les protéines synthétisées dans le corps cellulaire, qui contient le noyau, doivent donc être transportées sur de très grandes distances vers les terminaisons synaptiques. Les microtubules jouent un rôle très important dans ce transport. Leur extrémité (-) est dans le corps cellulaire et les extrémités (+) vers l'extrémité des axones. Pendant longtemps l'implication des microtubules dans le transport axonal soulevait un paradoxe: les seuls moteurs des microtubules connus, les dynéines, se déplacent vers l'extrémité (-). Ils pouvaient donc transporter des protéines ou des vésicules vers le corps cellulaire plutôt que vers l'extrémité synaptique. La découverte d'un nouveau moteur, capable de se déplacer le long d'un microtubule vers l'extrémité (+) résolut le paradoxe. Depuis, de très nombreuses kinésines ont été découvertes qui se distribuent en de nombreuses sous-famille en fonction de leur structure moléculaire. Les parentés structurales sont évidemment le reflet de leur parenté évolutive.

Une variabilité supplémentaire présentée par les kinésines est qu'elles se distribuent en trois grands types en fonction de la position du domaine moteur sur la chaîne lourde. Le moteur peut en effet être à l'une ou l'autre des extrémités de la chaîne lourde ou encore au

milieu. Dans le dernier cas, les kinésines ne vont plus vers le bout (+) mais vers le bout (-), comme les dynéines. Enfin, alors que comme dans le cas général des moteurs, les kinésines sont le plus souvent dimériques (deux chaînes lourdes), leur permettant de ‘marcher ‘ ou de ‘glisser’ vers une extrémité, certaines sont tétramériques, possédant quatre chaînes lourdes associées ‘tête bêche’, ce qui leur permet de se déplacer le long de deux microtubules en même temps, et donc de modifier la position réciproque de ces deux microtubules. Elles peuvent ainsi participer de manière active à l’organisation des réseaux microtubulaires. Une kinésine monomérique vient également d’être identifiée.

### *La super-famille des dynéines*

D’abord impliquées dans le mouvement ciliaire ou flagellaire, où elles jouent un rôle fondamental, les dynéines sont également responsables de nombreux mouvements intracellulaires. Les chaînes lourdes portant le domaine moteur des dynéines sont de très grande taille, très nettement supérieure à celle des chaînes lourdes de myosines ou de kinésines. La structure de ces chaînes lourdes est également beaucoup moins diversifiée que ne l’est celle des chaînes lourdes de myosines ou de kinésines. La diversité fonctionnelle des dynéines porte d’avantage sur les partenaires moléculaires avec lesquels elles peuvent interagir. Les chaînes régulatrices, de taille intermédiaire ou petite, sont nombreuses et moins connues, mais un moteur complet de dyneine est un très gros complexe de plusieurs protéines. De plus, une régulation supplémentaire des dynéines est fournie par un autre complexe protéique de très grosse taille, le complexe dynactine, qui curieusement contient un très court filament d’une molécule très voisine de l’actine. Sa localisation sur les membranes suggère un rôle important du complexe dynéine/dynactine dans l’interaction du système microtubulaire et des membranes (vésicules, membrane plasmique, membranes golgiennes, ...) aussi bien dans le trafic intracellulaire et la position ou l’orientation du fuseau mitotique par rapport au contour cellulaire que dans le mouvement cellulaire. Les mouvements intracellulaires assurés par les dynéines le long des microtubules mettent donc en jeu une énorme machinerie moléculaire dont le fonctionnement précis est encore loin d’être élucidé.

En résumé, les trois familles distinctes de moteurs moléculaires représentent un ensemble considérable de molécules directement impliquées dans la production de mouvement. Il faut remarquer cependant que si nous définissons ces molécules comme des « moteurs » en raison de leur implication directe dans le mouvement, il existe bien d’autres systèmes enzymatiques, impliqués dans d’autres fonctions cellulaires, qui se comportent comme des moteurs moléculaires. Leurs mouvements élémentaires peuvent d’ailleurs être observés par les mêmes méthodes. C’est le cas de l’ARN polymérase dont on a pu directement mesurer qu’elle développe une force équivalente ou supérieure à celle d’un moteur moléculaire lorsqu’elle se déplace le long d’une fibre d’ADN et la transcrit en séquence ARN.

## II. Les mécanismes de production de force.

### I.1. Structures élémentaires

#### *Le moteur des flagelles procaryotes*

Le moteur des flagelles prokaryotes est une des machines moléculaires les plus étonnantes du vivant (figure 3, en haut à droite). Il est constitué d’un rotor et d’un stator et utilise la différence de pH que la bactérie maintient entre son cytoplasme et l’extérieur pour créer un

flux de protons à travers le complexe moléculaire tenant lieu de stator. Ce flux vers le cytoplasme entraîne une rotation très rapide du rotor (150 fois par seconde). Il a été récemment démontré que ce moteur est en fait fondé sur le même principe que l'ATP synthétase, complexe présent dans tout organisme vivant pour convertir l'énergie 'électrique' d'un flux de protons en énergie chimique contenue dans la molécule d'ATP. L'ATP synthétase elle aussi est un petit système de rotor et stator. Le principe de cette machine qui transforme un flux de protons en un mouvement de rotation est utilisé dans le moteur flagellaire pour propulser la bactérie, et dans l'ATP synthétase pour accumuler de l'énergie (mais dans ce cas la rotation est beaucoup plus lente). Le plus étonnant est que la bactérie est aussi capable d'utiliser l'ATP synthétase à l'envers, hydrolysant de l'ATP pour créer un flux de protons dans l'autre sens et maintenir la différence de pH entre son cytoplasme et l'extérieur. On peut remarquer qu'il existe un lien évolutif entre ces deux moteurs rotatifs : l'ATP synthétase se trouve soit dans la membrane des mitochondries qui assurent la respiration cellulaire, soit dans celle des chloroplastes qui assurent la photosynthèse. Or ces deux organites sont, selon tous les critères utilisés, le résultat d'une symbiose ancienne entre des bactéries et des cellules eucaryotes primitives).

### *Polymérisation et production de force*

Pendant longtemps, l'ensemble moteur/filament, à cause de son rôle primordial dans des structures spécialisées comme le sarcomère du muscle ou le flagelle eucaryote, a été considéré comme le module universel de production de force. Mais la polymérisation des microtubules et des microfilaments, qui consomme de l'énergie, est elle-même capable de produire une force (figure 3, en bas à gauche). Cela a été démontré *in vitro* pour les microtubules, mais le rôle physiologique de cette force, dont il a été proposé qu'elle soit à l'origine du centrage du système centrosome/microtubules par l'exercice d'une force sur la périphérie cellulaire, n'est pas démontré (cf. CYTOSQUELETTE). La situation est plus claire dans le cas de l'actine dont on sait que sa polymérisation est à l'origine de la production d'extensions membranaires telles que lamellipodes et filopodes à l'origine du mouvement amiboïde des cellules (cf. CYTOSQUELETTE). Le mécanisme proposé pour comprendre cette production de force est appelé 'cliquet brownien' ('brownian ratchet' en anglais). Les filaments d'actine qui polymérisent à leur extrémité (+) au voisinage de la membrane cellulaire, seraient ancrés dans le cytoplasme par leur extrémité (-). Les fluctuations thermiques de la membrane ou de la courbure du filament libèreraient régulièrement un espace dans lequel pourraient venir s'insérer de nouveaux monomères, chaque monomère ajouté permettant de gagner du terrain. Des découvertes récentes ont démontré que ce mécanisme est également utilisé pour propulser des vésicules dans les cellules. Certaines bactéries pathogènes intracellulaires qui utilisent à leur profit ce mécanisme pour se déplacer dans les cellules qu'elles infectent ont servi de modèle pour comprendre ce type de propulsion (cf. MOUVEMENT CELLULAIRE).

Si ce mécanisme est à l'origine des forces de propulsion, les phénomènes de contraction sont le plus souvent dus au mouvement de moteurs moléculaires sur des filaments. Il faut cependant noter la présence de fibres contractiles très répandues chez les eucaryotes unicellulaires où elles sont particulièrement évidentes, dont la protéine constitutive essentielle est la centrine. Ces fibres sont probablement les structures contractiles les plus primitives (figure 3, en haut à gauche). La centrine appartient à la superfamille des calmodulines, protéines régulant de très nombreuses activités enzymatiques grâce à leur capacité de lier des ions  $Ca^{++}$  et par là d'effectuer un changement de sa conformation qui les rend plus compactes. Dans cette superfamille de 'protéines à calcium', seule la centrine ou des protéines très proches, sont capables de faire des fibres. On comprend aisément que si chaque monomère de

la fibre se raccourcit lorsque la concentration de  $\text{Ca}^{++}$  augmente, celle-ci se rétracte. Cette contraction, qui produit un mouvement parmi les plus rapides du vivant (de l'ordre du millimètre par seconde), est exploitée dans des réflexes de fuite de certains unicellulaires ou dans des mécanismes de défense. Le retour à l'état relâché est cependant beaucoup moins rapide, car il nécessite le re pompage du calcium libéré pour provoquer la contraction, la consommation d'énergie se faisant principalement à ce niveau (les pompes à calcium consomment de l'ATP).

### *Mouvement d'un moteur sur un filament*

Le mouvement d'un moteur moléculaire sur un filament polarisé est un des mécanismes de production de force les plus répandus chez les eucaryotes. Il repose sur un module structural de base dont les principes sont universels mais dont les composants moléculaires eux-mêmes peuvent varier considérablement. Ce module comporte deux éléments essentiels : un polymère constitué de sous-unités protéiques identiques et asymétriques, qui confèrent au polymère une polarité structurale, c'est-à-dire deux extrémités différentes, et une protéine possédant une activité ATPase, c'est-à-dire capable, lorsqu'elle est en interaction avec le polymère, d'hydrolyser l'ATP et d'utiliser l'énergie libérée pour se déplacer le long du polymère.

Les mouvements impliqués dans le trafic intracellulaire ou dans la mise en place des compartiments membranaires (cf. CELLULE), ou encore dans la ségrégation des chromosomes (cf. DIVISION CELLULAIRE) impliquent tous d'une manière ou d'une autre des moteurs moléculaires spécialisés. C'est aussi ce genre de module élémentaire qui sert de base aux structures contractiles des cellules amiboïdes et des muscles, ainsi qu'aux structures vibratiles des flagelles et des cils.

Les biologistes représentent souvent les moteurs, avec leur organisation dimérique le plus souvent, et leur structure caractéristique en plusieurs domaines, la tête, la tige et la queue, comme des équilibristes évoluant sur un fil grâce à un mécanisme qui ressemble à la marche dans le cas des myosines, ou au glissement du skieur de fond dans le cas des kinésines et des dynéines. Ces images naïves, mais parlantes, seront progressivement remplacées par des modèles plus réalistes et moins intuitifs, qui prendront en compte les mesures expérimentales de plus en plus fines. Il faut s'attendre cependant à de longues controverses avant qu'un modèle fasse l'unanimité, tant l'observation du mouvement élémentaire d'un moteur individuel sur un filament et la mesure de l'énergie libérée sont délicates.

Récemment, un modèle probabiliste a été proposé pour décrire le déplacement d'un moteur sur un filament (figure 3, en bas à droite). On peut présenter ce modèle de manière très simplifiée. L'idée centrale est que le changement de conformation du moteur, lié à l'hydrolyse de l'ATP, modifie le potentiel d'interaction entre le moteur et le filament. Pour simplifier, on peut considérer que ce changement de conformation fait passer le moteur d'un état lié au filament à un état de libre diffusion dans le milieu environnant. On peut aussi faire l'hypothèse que le potentiel d'interaction entre le moteur et le filament est périodique et asymétrique, du fait de la périodicité et de la polarité structurale des polymères de tubuline ou d'actine. Ainsi, quand le moteur se lie au filament, il se place au minimum local du potentiel d'interaction et y demeure jusqu'à ce qu'il se détache. Il va alors diffuser librement sur une certaine distance, puis se lier de nouveau. Si la distance de diffusion est inférieure à la période du potentiel d'interaction, il peut se lier en arrière ou en avant du minimum local précédent. Dans le premier cas, il reviendra au même endroit. Dans le second, en raison de l'asymétrie du potentiel d'interaction, il tombera dans le minimum local suivant et aura donc avancé d'une unité de longueur. Il a donc une chance sur deux de rester sur place et une chance sur deux d'avancer. S'il est resté sur place, le même cycle de dissociation et de re-association se

produit, et l'on comprend que le moteur a une probabilité de plus en plus faible de rester sur place (en  $1/2^n$ , où  $n$  est le nombre de cycles d'attachement/détachement). Les deux paramètres très importants pour la validité de ce scénario sont les probabilités de passage d'un potentiel à l'autre. Il faut que le moteur reste suffisamment longtemps attaché pour glisser jusqu'au minimum local de potentiel et il ne faut pas qu'il reste trop longtemps détaché, sinon il diffusera sur de trop grandes distances et perdra toute 'mémoire' de l'endroit où il était attaché précédemment. Ce modèle a été validé expérimentalement dans un système entièrement artificiel : des billes de latex ont pu être transportées d'un point à un autre en sautant de manière probabiliste le long de surfaces chargées de manière asymétrique et périodique.

Pour des raisons encore peu connues, les moteurs qui se déplacent sur les microfilaments (myosines) et ceux qui se déplacent sur les microtubules (dynéines et kinésines) fonctionnent très différemment : les myosines ne s'attachent que très peu de temps au microfilament, le temps de produire une force appliquée quasi ponctuellement dans l'espace et le temps. En revanche, les kinésines et les dynéines avancent sur de grandes distances sans se détacher du microtubule ; on dit de ces moteurs qu'ils sont processifs. Ces comportements ont des conséquences très importantes sur les capacités d'organisation des filaments par les moteurs. Par exemple, les myosines se décrochent sans cesse de leur filament, pouvant même passer d'un filament à un autre, alors que les kinésines vont évoluer jusqu'au bout du microtubule et y rester ancrées un certain temps. C'est cette différence qui explique la capacité d'un gel d'actine et de myosine à se contracter, alors que les kinésines en interaction avec des microtubules vont organiser des asters.

De nombreuses équipes, en physique comme en biologie, se penchent aujourd'hui sur les subtilités liées à ces propriétés fines des interactions entre les moteurs et les polymères polarisés, et sur la difficile question de la conversion de l'énergie chimique de liaison de l'ATP en travail mécanique (production de force). Les caractéristiques propres aux polymères sont évidemment fondamentales (rigidité, longueur moyenne, dynamique de polymérisation). Mais les propriétés les plus étonnantes ne peuvent être expliquées qu'en considérant des comportements collectifs, c'est-à-dire des assemblées de moteurs agissant sur des filaments de manière coordonnée.

Cette coordination est réalisée dans des structures spécialisées dont les deux exemples les plus courants sont la myofibrille et le flagelle.

## II.2. Les structures spécialisées dans la production de mouvement

Les microfilaments d'actine et les microtubules peuvent participer à la production de mouvement de trois manières différentes, qui probablement sont apparues séquentiellement au cours de l'Evolution.

L'assemblage lui-même des polymères représente la première manière de produire du mouvement. On sait aujourd'hui que toute l'activité de déformation vers l'avant d'une cellule migratrice est due à l'assemblage de polymères d'actine à l'avant de la cellule, et que des bactéries pathogènes se déplacent dans les cellules en contrôlant à leur profit la polymérisation de l'actine. Dans le cas des microtubules, il est possible que leur assemblage ou désassemblage contrôle certains mouvements des chromosomes durant la mitose. La force développée par un microtubule qui pousse contre une paroi est de l'ordre de quelques piconewtons, comme celle développée par un moteur.

L'utilisation de moteurs moléculaires individuels est la seconde manière de produire du mouvement. Elle est exploitée pour transporter des 'cargos' de toute nature dans la cellule, ou pour produire une supra organisation des polymères les uns par rapport aux autres.

Enfin la production de mouvements rapides peut être obtenue grâce des superstructures spécialisées qui correspondent à des assemblages stables de polymères sur lesquels des moteurs fonctionnent collectivement. Les exemples les plus achevés sont d'une part la myofibrille du muscle et d'autre part le cil ou le flagelle des organismes unicellulaires eucaryotes ou chez les métazoaires, des épithéliums ciliés et des spermatozoïdes des métazoaires (figure 4).

### *La myofibrille musculaire*

Les fibres des muscles squelettiques sont en fait des cellules géantes multinucléées issues de la fusion de nombreuses cellules précurseurs. Elles peuvent atteindre chez l'homme une longueur de 50 cm et un diamètre de 50  $\mu\text{m}$  et contiennent un système hypertrophié de microfilaments d'actine et de moteurs de type myosine constitués en myofibrilles qui remplissent pratiquement tout l'espace cellulaire (les noyaux sont repoussés sous la membrane plasmique). Chaque myofibrille, longue structure cylindrique d'environ 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, présente une striation transversale caractéristique (à l'origine de l'appellation "muscle strié" pour les muscles squelettiques ou cardiaques, par opposition aux "muscles lisses" des viscères qui ont une organisation différente). Les striations correspondent à un enchaînement de 10 à 20 000 unités contractiles, ou sarcomères, qui mesurent environ 2,5  $\mu\text{m}$  de long et sont constituées d'un arrangement précis de microfilaments d'actine et de filaments épais, eux-mêmes constitués d'un assemblage bipolaire de molécules de myosine. L'organisation bipolaire des filaments de myosine, rendue possible grâce à l'association des molécules individuelles de myosine par leur partie rigide non motrice, a pour effet de disposer les têtes motrices aux deux extrémités des filaments épais. Cette organisation est la clé du fonctionnement des sarcomères. En effet, en présence d'ATP, les filaments bipolaires de myosine, qui sont disposés longitudinalement dans la partie médiane du sarcomère, peuvent glisser en même temps sur des filaments d'actine anti-parallèles ancrés aux deux extrémités du sarcomère. Ce glissement entraîne un raccourcissement du sarcomère, par un mouvement équivalent des deux extrémités du sarcomère vers le centre, et constitue la base moléculaire de la contraction musculaire. On peut aujourd'hui observer de manière très précise le raccourcissement, d'environ 20 %, de chaque sarcomère au cours de la contraction musculaire, et observer qu'il correspond bien à un glissement des deux types de filaments les uns par rapport aux autres.

### *Le cil ou le flagelle des cellules eucaryotes*

Les cils et flagelles, appendices cellulaires fins et vibratiles, ont une structure interne, ou axonème, très semblable dans toutes les cellules eucaryotes, des unicellulaires à l'homme. Les mécanismes à la base du mouvement sont identiques, même si en raison de leur différence de longueur, les cils, courts, battent plutôt comme des fouets, et les flagelles, beaucoup plus longs, propagent des ondes pratiquement sinusoïdales. L'axonème est essentiellement constitué de microtubules, dont la polarité (-) vers (+) correspond à son axe proximo-distal, et son mouvement est généré par des moteurs de type dynéine.

L'axonème est un cylindre de 0,2  $\mu\text{m}$  de diamètre dont la paroi est formée de 9 microtubules disposés selon une parfaite symétrie radiale et interagissant entre eux tangentiellement par des "bras" qui correspondent à des rangées de moteurs de type dynéine. L'axe du cylindre est constitué d'une paire de microtubules sur lesquels est fixé un empilement régulier de petits disques protéiques inclinés à environ 15 degrés par rapport à l'axe. Cette structure centrale interagit avec la structure tangentielle par 9 rangées de structures radiales. Le motif structural

(9+2) de l'axonème des eucaryotes (9 microtubules périphériques + 2 microtubules axiaux) ne fut découvert qu'avec l'avènement de la microscopie électronique. L'empilement régulier des différentes structures associées aux microtubules peut avoir une période variable selon la structure considérée, ou l'espèce analysée, mais celle-ci est toujours un multiple de 8 nm, qui est la dimension longitudinale d'un hétérodimère  $\alpha/\beta$  de tubuline. Les microtubules apportent ainsi le motif structural au principe de la construction de l'axonème: ils permettent de fabriquer un édifice complexe et motile sur de très grandes longueurs. La structure des axonèmes a été décrite avec beaucoup de précision, mais la manière dont le battement ciliaire ou flagellaire est contrôlé et parfaitement entretenu avec une fréquence allant de 10 à 50 hertz, reste encore, 50 ans plus tard, largement incompris. Il est cependant établi que le mouvement est généré par le glissement sur de petites distances des microtubules périphériques les uns par rapport aux autres et qu'il peut être produit tout au long de l'axonème.

Cela est rendu possible grâce à une invention structurale supplémentaire que l'on n'observe que dans les édifices microtubulaires motiles : les microtubules périphériques sont en fait constitués en "doublets" contenant un microtubule complet, à 13 protofilaments (voir plus haut) dit microtubule A, et un microtubule incomplet contenant 10 ou 11 protofilaments, dit microtubule B. Cette structure en doublet permet de fixer régulièrement des moteurs dyneine le long d'un microtubule complet A par leur partie non motrice. L'espace entre deux doublets adjacents permet aux moteurs fixés de manière stable sur un microtubule A d'interagir en présence d'ATP par leurs têtes motrices avec le microtubule B du doublet adjacent, et d'exercer sur ce dernier une force vers l'extrémité distale de l'axonème. L'orientation AB des 9 doublets, et donc celle des bras de dynéine, étant la même, chaque doublet  $n$  peut faire glisser le doublet  $n+1$  dans la direction proximo-distale, et peut lui-même être déplacé vers le haut par les dynéines associées au doublet  $n-1$ . Mais tous les doublets étant fixés par leur base sur le corps basal/centriole, le glissement d'un doublet par rapport au doublet adjacent produit une courbure (comme l'ouverture d'un livre fait glisser les unes par rapport aux autres les pages qui sont toutes fixées ensemble au dos du livre). La manière dont la courbure est propagée et relaxée n'est pas complètement comprise mais il est clair que la structure axiale joue un rôle important.

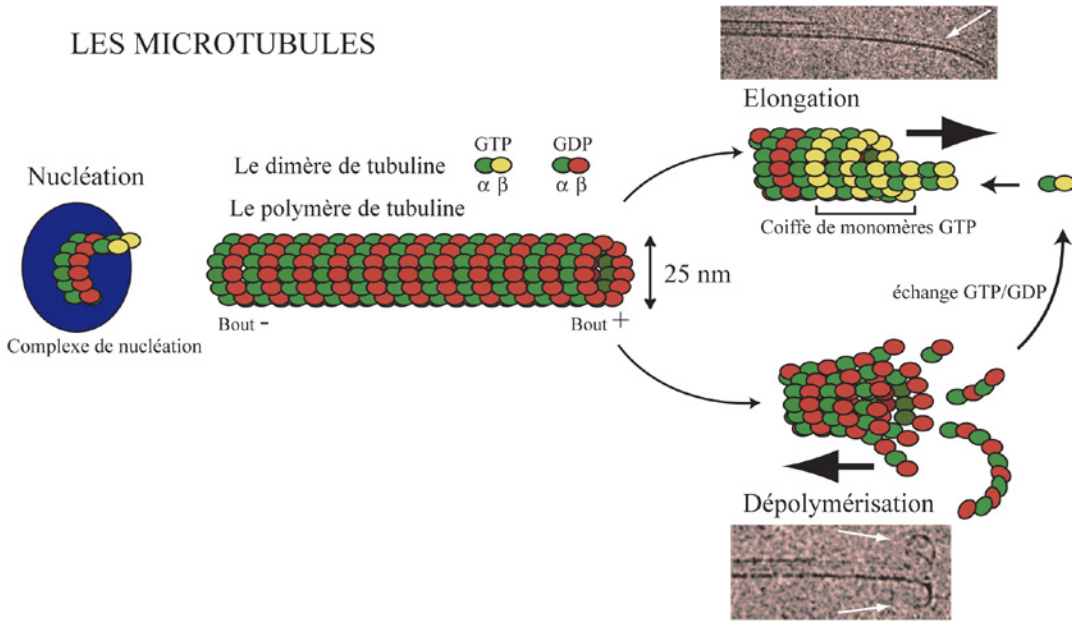
Le glissement des doublets les uns par rapport aux autres a pu être démontré directement sur des cils démembrés (par un détergent) et dont différentes connections protéiques non décrites ici ont été affaiblies par un traitement aux protéases. Sur de telles préparations, l'addition d'ATP provoque un glissement maximum de chaque doublet par rapport au doublet précédent, transformant l'axonème en une structure télescopée 9 fois plus longue. On ne sait pas comment le glissement est contrôlé dans une structure cylindrique aussi complexe, et les modèles proposés jusqu'à maintenant ne sont pas entièrement satisfaisants. Un modèle d'oscillation entretenue dans une structure plus simple, plane et à deux doublets seulement, a pu être proposé par des physiciens.

Remarquable pièce d'horlogerie, réclamant pour son mouvement une coordination dans les trois axes (tangential, radial et longitudinal) qui défie l'entendement, l'axonème est capable de battre tout en croissant. Il existe une coordination supplémentaire étonnante entre deux flagelles d'une même cellule : chez les algues unicellulaires bi-flagellées telles que *Chlamydomonas reinhardtii*, on peut expérimentalement casser l'un des deux flagelles. Dans ce cas, l'autre flagelle régresse en taille jusqu'à atteindre la dimension du flagelle cassé. Après quoi les deux flagelles, qui n'ont pas cessé de battre, repoussent de manière symétrique.

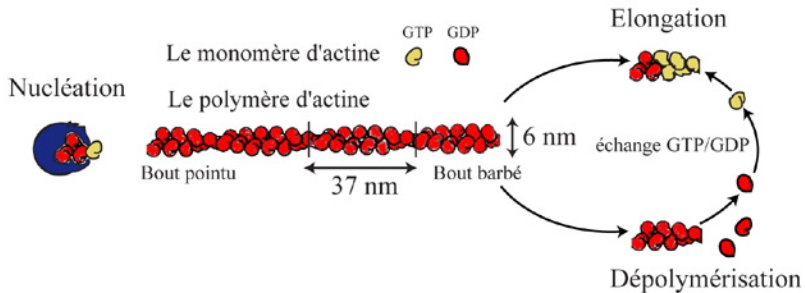
Bibliographie: Jülicher F. and J. Prost, Phys.Rev.lett. 75, 2618 (1995) ; Loisel T.P., Boujemaa R., Pantaloni D., Carlier M-F., Nature , 401 : 613-616 (1999) ; D.Bray, Cell Movements, Garland Publishing Inc. (1992).

# FIG 1 Les polymères dynamiques du cytosquelette

## LES MICROTUBULES



## LES MICROFILAMENTS



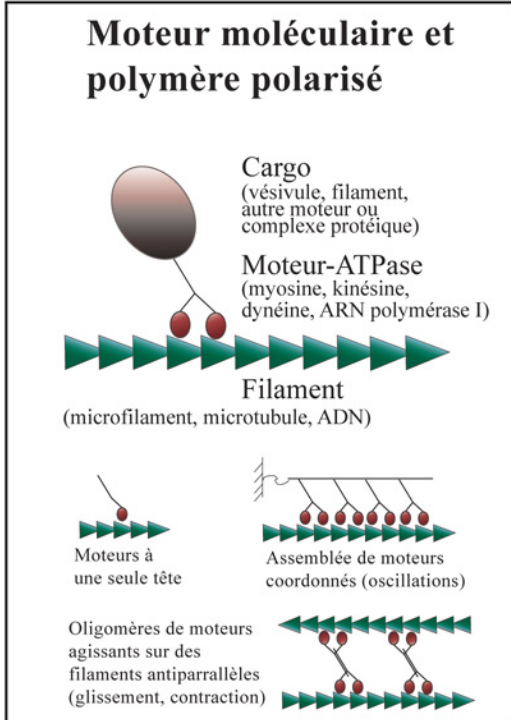
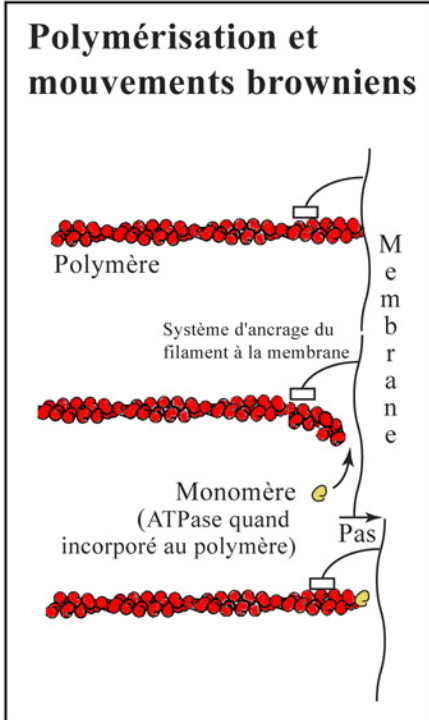
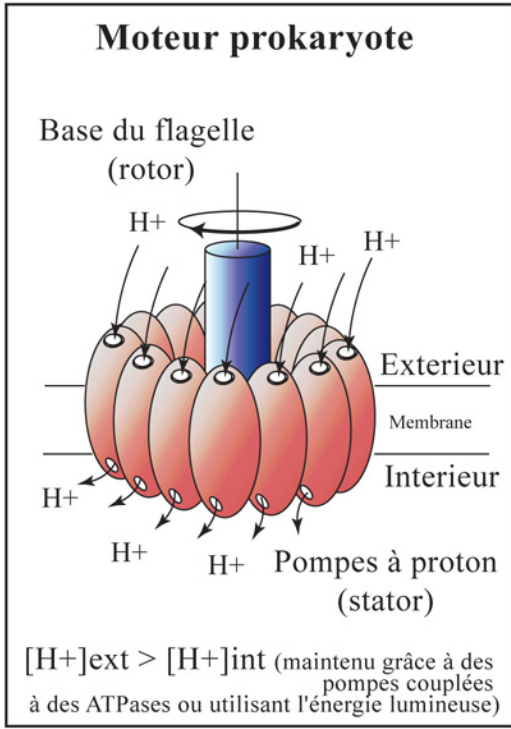
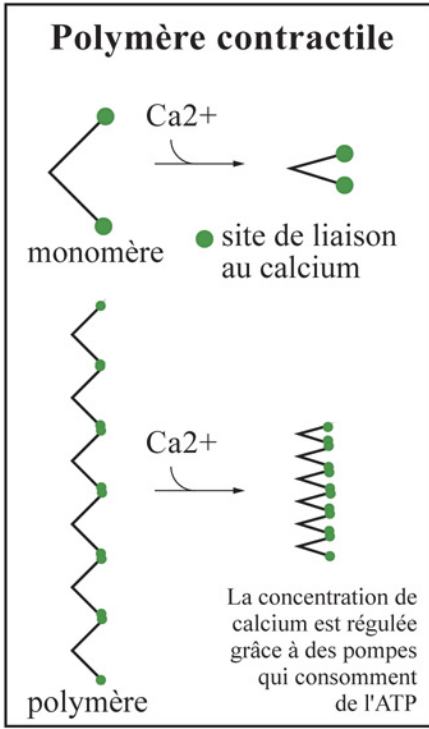








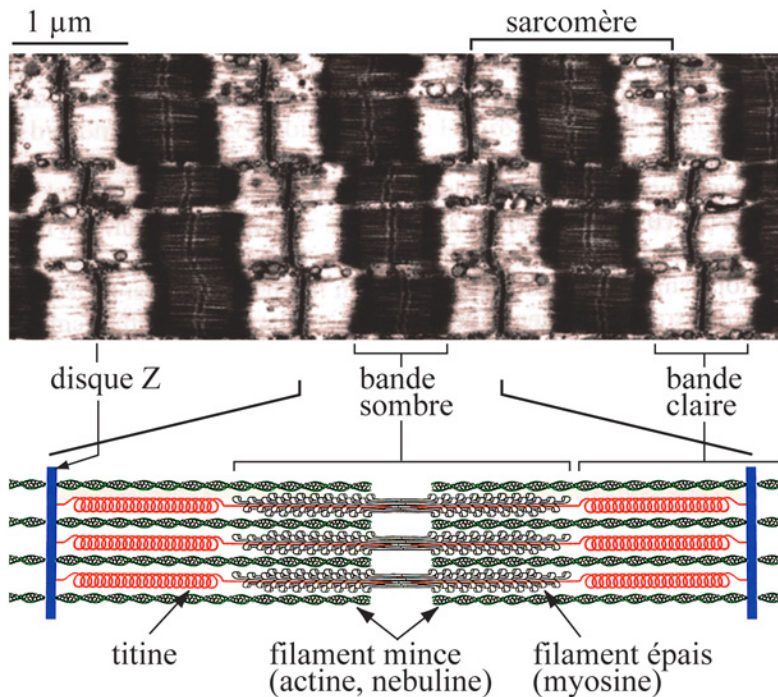
**FIG 3 Les mécanismes élémentaires de production de force**



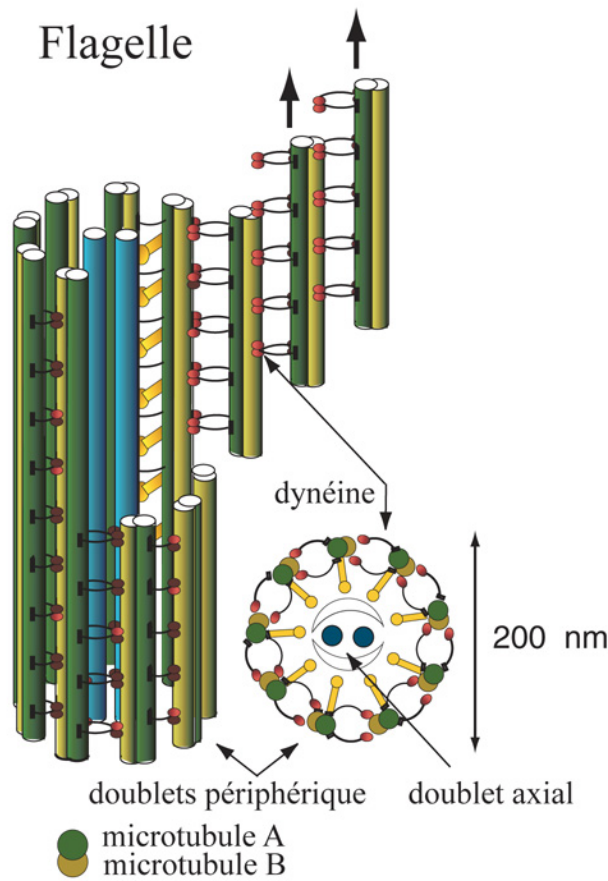


**FIG 4** Structures spécialisées

### Myofibrille



### Flagelle





# BIBLIOGRAPHIE

## Livres

- Bornens M.** Ed. (1999). The Centrosome. *Biology of the Cell* (Vol 91, N° 4-6).
- Bray D.** (2001). *Cell Movements* (2ième Ed.). Garland Publishing (New York).
- Hyams J.S. et Lloyd C.W.** Eds. (1994). *Microtubuyles. Modern Cell Biology* (vol. 11). Wiley-Liss (New York).
- Kalnins V.I. Ed.** (1992). The Centrosome. *Cell Biology : a Series of Monographs*. Academic Press (London).
- Lecointre G. et Le Guyader H.**(2001). *Classification phylogénétique du vivant. Illustrations de Visset D.* Editions Belin (Paris).
- Lwoff A.** (1950). *Problems of Morphogenesis in Ciliates. Biological Research Series.* John Wiley and Sons, Inc. (New York).
- Palazzo R.E. et Davis T.N.** Eds. (2001). *Centrosomes and Spindle Pole Bodies. Methods in Cell Biology* (vol. 67). Academic press (London).
- Palazzo R.E. et Schatten G.P.** Eds. (2000). *The Centrosome in Cell Replication and Early Development. Current Topics in Developmental Biology* (vol. 49). Academic Press (London).
- Rieder C.L.** Ed. (1999). *Mitosis and Meiosis. Methods in Cell Biology* (vol. 61). Academic Press (London).
- Wheatley, D.N.** (1982). *The Centriole : A Central Enigma of Cell Biology.* Elsevier Biomedical Press (Amsterdam).
- Wilson E.B.** (1925). *The Cell in Development and Heredity* (3ième Ed.). The Macmillan Company (New York).

## Références à valeur historique

- van Beneden, E.** (1876). Contribution à l'histoire de la vésicule germinative et du premier stade embryonnaire. *Bull. Acad. Roy. Belgique* 42, 35-97.
- van Beneden, E. et Neyt, A.** (1887) Nouvelles recherches sur la fécondation et la division mitotique chez l'Ascaride mégalocéphale. *Bull. Acad. Roy. Belgique* 3 ser. VII
- Boveri, T.** (1887). *Über die Befruchtung der Eier von *Ascaris megaloccephala*.* *Sitz.-Ber. Ges. Morph. Phys. München*. III, P. 153.
- Boveri, T.** (1901). *Über die Natur der Centrosomen.* *Jena. Z. Med. Naturw.* 28, 1-220.



- Boveri, T.** (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Fisher-Verlag, Jena. (version anglaise par M. Boveri, 1929. The Origin of Malignant Tumors. Waverly Press, Baltimore, MD)
- Delage, Y. et Goldsmith, M.** (1913). La parthénogénèse Naturelle et Expérimentale. Flammarion, Paris.
- Flemmng, W.**(1875). Studien in der Entwicklungsgeschichte der Najaden. S. B. Akad. Wiss. Wien 71-81.
- Flemming, W.**(1896). Die neuesten Ansichten über die Zellteilung und ihre Mechanik. Zoöl. Centralb. III, 2.
- Fry, H.J.** (1229). The so-called central bodies in fertilized *Echinarachnius* eggs. I-III. Biol. Bull. 56, 101-158.
- Fürst, E.** (1898). Über Centrosomen bei *Ascaris*. Arch. Mikr. Anat. 52, 97-134.
- Heidenhein, M.** (1907). Plasma und Zelle. Pt. 1. Fisher, Jena. pp. 1-506.
- Henneguy, L.-F.** (1898). Sur les rapports des cils vibratiles avec les centrosomes. Arch. Anat. Microscop. Morph. Expl. 1, 481-496.
- von Lehnossék, M.** (1898). Über Flimmerzellen. Verh. Anat. Gest. Kiel 12, 106-128.
- von Lehnossék, M.** (1899). Das Mikrocentrum der glatten Muskelzellen. Anat. Anzeiger 16, 334.
- Loeb, J.** (1913). Artificial Parthenogenesis and Fertilization. University of Chicago Press, Chicago.
- Morgan, T.H.** (1899). The action of salt solutions on the unfertilised eggs of *Arbacia*. Arch. Entwicklungsmech. Organ. 8, 448-539.
- Strasburger, E.** (1897). Kerntheilung und Befruchtung bei *Fucus*. Jahrb. wiss. Bot. 30, 351-374.

## Bibliographie alphabétique

- Adames, N.R., and J.A. Cooper.** 2000. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 149:863-74.
- Adams, I.R., and J.V. Kilmartin.** 1999. Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 145:809-823.
- Adams, I.R., and J.V. Kilmartin.** 2000. Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Tr Cell Biol.* 10:329-335.
- Adams, R.R., M. Carmena, and W.C. Earnshaw.** 2001a. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 11:49-54.
- Adams, R.R., H. Maiato, W.C. Earnshaw, and M. Carmena.** 2001b. Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol.* 153:865-80.
- Adams, R.R., S.P. Wheatleya, A.M. Gouldsworthy, S.E. Kandels-Lewis, M. Carmena, C. Smythe, D.L. Gerloff, and W.C. Earnshaw.** 2000. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol.* 10:1075-8.
- Ahmad, F.J., W. Yu, F.J. McNally, and P.W. Baas.** 1999. An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J Cell Biol.* 145:305-15.
- Albrecht-Buehler, G.** 1977. Phagokinetic tracks of 3T3 cells: parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. *Cell.* 12:333-9.

- Albrecht-Buehler, G.** 1979. The angular distribution of directional changes of guided 3T3 cells. *J Cell Biol.* 80:53-60.
- Albrecht-Buehler, G.** 1980. Autonomous movements of cytoplasmic fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:6639-43.
- Albrecht-Buehler, G., and A. Bushnell.** 1979. The orientation of centrioles in migrating 3T3 cells. *Exp Cell Res.* 120:111-8.
- Albrecht-Buehler, G., and A. Bushnell.** 1980. The ultrastructure of primary cilia in quiescent 3T3 cells. *Exp Cell Res.* 126:427-37.
- Alieva, I.B., and I.A. Vorobjev.** 1994. Centrosome behavior under the action of a mitochondrial uncoupler and the effect of disruption of cytoskeleton elements on the uncoupler-induced alterations. *Journal of Structural Biology.* 113:217-24.
- Alieva, I.B., and I.A. Vorobjev.** 1995. Centrosome behaviour and orientation of centrioles under the action of energy transfer inhibitors. *Cell Biology International.* 19:103-12.
- Allen, C., and G.G. Borisy.** 1974. Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. *J Mol Biol.* 90:381-402.
- Amano, M., K. Chihara, K. Kimura, Y. Fukata, N. Nakamura, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi.** 1997. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 275:1308-11.
- Amano, M., Y. Fukata, and K. Kaibuchi.** 2000. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 261:44-51.
- Amos, W.B., L.M. Routledge, and F.F. Yew.** 1975. Calcium-binding proteins in a vorticellid contractile organelle. *Journal of Cell Science.* 19:203-13.
- Andersen, S.S.** 1999. Molecular characteristics of the centrosome. *Int Rev Cytol.* 187:51-109.
- Andersen, S.S.** 2000. Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol.* 10:261-7.
- Anderson, D.C., L.J. Wible, B.J. Hughes, C.W. Smith, and B.R. Brinkley.** 1982. Cytoplasmic microtubules in polymorphonuclear leukocytes: effects of chemotactic stimulation and colchicine. *Cell.* 31:719-29.
- Anderson, R.G., and R.M. Brenner.** 1971. The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct. *J Cell Biol.* 50:10-34.
- Andersson, L.C., V.P. Lehto, S. Stenman, R.A. Badley, and I. Virtanen.** 1981. Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature.* 291:247-8.
- Andreassen, P.R., O.D. Lohez, F.B. Lacroix, and R.L. Margolis.** 2001. Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell.* 12:1315-28.
- Antonio, C., I. Ferby, H. Wilhelm, M. Jones, E. Karsenti, A.R. Nebreda, and I. Vernos.** 2000. Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell.* 102:425-35.
- Araki, M., C. Masutani, M. Takemura, A. Uchida, K. Sugasawa, J. Kondoh, Y. Ohkuma, and F. Hanaoka.** 2001. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem.* 276:18665-72.
- Aspenstrom, P.** 1999. Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol.* 11:95-102.
- Baas, P.W.** 1997. Microtubules and axonal growth. *Curr Opin Cell Biol.* 9:29-36.
- Bacallao, R., C. Antony, C. Dotti, E. Karsenti, E.H. Stelzer, and K. Simons.** 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol.* 109:2817-32.

- Bakker, B.M., F.I. Mensonides, B. Teusink, P. van Hoek, P.A. Michels, and H.V. Westerhoff.** 2000. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2087-92.
- Balaban, N.Q., U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger.** 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol.* 3:466-72.
- Balasubramanian, M.K., D. McCollum, and U. Surana.** 2000. Tying the knot: linking cytokinesis to the nuclear cycle. *J Cell Sci.* 113:1503-13.
- Balczon, R.** 2000. Centrosome replication in somatic cells: the significance of G1 phase. *Curr Top Dev Biol.* 49:251-66.
- Balczon, R., L. Bao, W.E. Zimmer, K. Brown, R.P. Zinkowski, and B.R. Brinkley.** 1995. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol.* 130:105-15.
- Bandmann, U., L. Rydgren, and B. Norberg.** 1974. The difference between random movement and chemotaxis. Effects of antitubulins on neutrophil granulocyte locomotion. *Exp Cell Res.* 88:63-73.
- Banks, J.D., and R. Heald.** 2001. Chromosome movement: dynein-out at the kinetochore. *Curr Biol.* 11:R128-31.
- Bardin, A.J., R. Visintin, and A. Amon.** 2000 JUL 7. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell.* 102:21-31.
- Baron, A.T., and J.L. Salisbury.** 1992. Role of centrin in spindle pole dynamics. In *The centrosome.* V.I. Kalnins, editor. Academic Press, San Diego. 167-195.
- Baron, A.T., V.J. Suman, E. Nemeth, and J.L. Salisbury.** 1994. The pericentriolar lattice of PtK2 cells exhibits temperature and calcium-modulated behavior. *Journal of Cell Science.* 107:2993-3003.
- Baum, P., C. Furlong, and B. Byers.** 1986. Yeast gene required for spindle pole body duplication: homology of its product with Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:5512-6.
- Baum, P., C. Yip, L. Goetsch, and B. Byers.** 1988. A yeast gene essential for regulation of spindle pole duplication. *Mol Cell Biol.* 8:5386-97.
- Beisson, J., and M. Jerka-Dziadosz.** 1999. Polarities of the centriolar structure: morphogenetic consequences. *Biol Cell.* 91:367-78.
- Beisson, J., and T.M. Sonnenborn.** 1965. Cytoplasmic inheritance of the organisation of the cell cortex in *Paramecium aurelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 53:275-282.
- Bellaiche, Y., M. Gho, J.A. Kaltschmidt, A.H. Brand, and F. Schweisguth.** 2001. Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol.* 3:50-7.
- Bergen, L.G., R. Kuriyama, and G.G. Borisy.** 1980. Polarity of microtubules nucleated by centrosomes and chromosomes of Chinese hamster ovary cells in vitro. *J Cell Biol.* 84:151-9.
- Bernhard, W., and E. de Harven.** 1956. Sur la présence dans certaines cellules de mammifère d'un organite de nature probablement centriolaire. Etude au microscope électronique. *Comp.Rend.Acad.Sc.* 242:288-290.
- Berns, M.W., R.S. Olson, and D.E. Rounds.** 1969. In vitro production of chromosomal lesions with an argon laser microbeam. *Nature.* 221:74-5.
- Berns, M.W., J.B. Rattner, S. Brenner, and S. Meredith.** 1977. The role of the centriolar region in animal cell mitosis. A laser microbeam study. *J Cell Biol.* 72:351-67.

- Berns, M.W., and S.M. Richardson.** 1977. Continuation of mitosis after selective laser microbeam destruction of the centriolar region. *J Cell Biol.* 75:977-82.
- Bershadsky, A., A. Chausovsky, E. Becker, A. Lyubimova, and B. Geiger.** 1996. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol.* 6:1279-89.
- Bershadsky, A.D., E.A. Vaisberg, and J.M. Vasiliev.** 1991. Pseudopodial activity at the active edge of migrating fibroblast is decreased after drug-induced microtubule depolymerization. *Cell Motil Cytoskeleton.* 19:152-8.
- Bershadsky, A.D., and J.M. Vasiliev.** 1993. Mechanisms of regulation of pseudopodial activity by the microtubule system. *Symp Soc Exp Biol.* 47:353-73.
- Bienz, M.** 2001. Spindles cotton on to junctions, APC and EB1. *Nat Cell Biol.* 3:E67-8.
- Bisgrove, S.R., and D.L. Kropf.** 1998. Alignment of centrosomal and growth axes is a late event during polarization of *Pelvetia compressa* zygotes. *Dev Biol.* 194:246-56.
- Blangy, A., H.A. Lane, P. d'Herin, M. Harper, M. Kress, and E.A. Nigg.** 1995. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell.* 83:1159-69.
- Bloecher, A., G.M. Venturi, and K. Tatchell.** 2000. Anaphase spindle position is monitored by the BUB2 checkpoint. *Nat Cell Biol.* 2:556-558.
- Bloom, K.** 2001. Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. *Curr Biol.* 11:R326-9.
- Bobinnec, Y., M. Fukuda, and E. Nishida.** 2000. Identification and characterization of *Caenorhabditis elegans* gamma-tubulin in dividing cells and differentiated tissues. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3747-59.
- Bobinnec, Y., A. Khodjakov, L.M. Mir, C.L. Rieder, B. Edde, and M. Bornens.** 1998a. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol.* 143:1575-89.
- Bobinnec, Y., M. Moudjou, J.P. Fouquet, E. Desbruyeres, B. Edde, and M. Bornens.** 1998b. Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 39:223-32.
- Boleti, H., E. Karsenti, and I. Vernos.** 1996. Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. *Cell.* 84:49-59.
- Bonaccorsi, S., M.G. Giansanti, and M. Gatti.** 2000. Spindle assembly in *Drosophila* neuroblasts and ganglion mother cells. *Nat Cell Biol.* 2:54-6.
- Borisy, G.G.** 1978. Polarity of microtubules of the mitotic spindle. *J Mol Biol.* 124:565-70.
- Borisy, G.G., and T.M. Svitkina.** 2000. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol.* 12:104-12.
- Bornens, M.** 1977. Is the centriole bound to the nuclear membrane? *Nature.* 270:80-2.
- Bornens, M.** 1991. Cell polarity: intrinsic or externally imposed? *New Biol.* 3:627-36.
- Bornens, M., and E. Karsenti.** 1984. *The Centrosome.* John Wiley and Sons, New York. 100-177 pp.
- Bornens, M., M. Paintrand, and C. Celati.** 1989. The cortical microfilament system of lymphoblasts displays a periodic oscillatory activity in the absence of microtubules: implications for cell polarity. *Journal of Cell Biology.* 109:1071-83.
- Boucher, D., J.C. Larcher, F. Gros, and P. Denoulet.** 1994. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry.* 33:12471-7.
- Bouckson-Castaing, V., M. Moudjou, D.J. Ferguson, S. Mucklow, Y. Belkaid, G. Milon, and P.R. Crocker.** 1996. Molecular characterisation of ninein, a new coiled-coil protein of the centrosome. *J Cell Sci.* 109:179-90.

- Bray, D., M.D. Levin, and C.J. Morton-Firth.** 1998. Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature*. 393:85-8.
- Bre, M.H., T.E. Kreis, and E. Karsenti.** 1987. Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: the occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J Cell Biol.* 105:1283-96.
- Bre, M.H., R. Pepperkok, A.M. Hill, N. Levilliers, W. Ansorge, E.H. Stelzer, and E. Karsenti.** 1990. Regulation of microtubule dynamics and nucleation during polarization in MDCK II cells. *J Cell Biol.* 111:3013-21.
- Brewis, N.D., A.J. Street, A.R. Prescott, and P.T. Cohen.** 1993. PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *Embo J.* 12:987-96.
- Brinkley, B.R.** 1985. Microtubule organizing centers. *Annu Rev Cell Biol.* 1:145-72.
- Brinkley, B.R.** 2001. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* 11:18-21.
- Brooks, R.F., D.C. Bennett, and J.A. Smith.** 1980. Mammalian cell cycles need two random transitions. *Cell.* 19:493-504.
- Brown, D.L., J.E. Little, N. Chaly, I. Schweitzer, and M. Paulin-Levasseur.** 1985. Effects of taxol on microtubule organization in mouse splenic lymphocytes and on response to mitogenic stimulation. *Eur J Cell Biol.* 37:130-9.
- Buendia, B., M.H. Bre, G. Griffiths, and E. Karsenti.** 1990. Cytoskeletal control of centrioles movement during the establishment of polarity in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 110:1123-35.
- Burack, W.R., and A.S. Shaw.** 2000. Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol.* 12:211-6.
- Burke, D.J.** 2000. Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev.* 10:26-31.
- Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, and J.R. De Mey.** 1998. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol.* 8:541-4.
- Byers, B., K. Shriver, and L. Goetsch.** 1978. The role of spindle pole bodies and modified microtubule ends in the initiation of microtubule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 30:331-52.
- Calarco-Gillam, P.D., M.C. Siebert, R. Hubble, T. Mitchison, and M. Kirschner.** 1983. Centrosome development in early mouse embryos as defined by an autoantibody against pericentriolar material. *Cell.* 35:621-9.
- Cameron, L.A., M.J. Footer, A. van Oudenaarden, and J.A. Theriot.** 1999. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4908-13.
- Carazo-Salas, R.E., O.J. Gruss, I.W. Mattaj, and E. Karsenti.** 2001. Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat Cell Biol.* 3:228-34.
- Carazo-Salas, R.E., G. Guarguaglini, O.J. Gruss, A. Segref, E. Karsenti, and I.W. Mattaj.** 1999. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature.* 400:178-81.
- Carlier, M.F., D. Didry, and D. Pantaloni.** 1997. Hydrolysis of GTP associated with the formation of tubulin oligomers is involved in microtubule nucleation. *Biophys J.* 73:418-27.
- Carminati, J.L., and T. Stearns.** 1997. Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol.* 138:629-41.
- Caudron, N., O. Valiron, Y. Usson, P. Valiron, and D. Job.** 2000. A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro. *J Mol Biol.* 297:211-20.

- Cerutti, L., and V. Simanis.** 1999. Asymmetry of the spindle pole bodies and spg1p GAP segregation during mitosis in fission yeast. *J Cell Sci.* 112:2313-21.
- Cerutti, L., and V. Simanis.** 2000. Controlling the end of the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* 10:65-9.
- Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand, and C. Pous.** 2001. The golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell.* 12:2047-60.
- Chang, P., and T. Stearns.** 2000. Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat Cell Biol.* 2:30-5.
- Chapman, M.J., M.F. Dolan, and L. Margulis.** 2000. Centrioles and kinetosomes: form, function, and evolution. *Q Rev Biol.* 75:409-29.
- Chausovsky, A., A.D. Bershadsky, and G.G. Borisy.** 2000. Cadherin-mediated regulation of microtubule dynamics. *Nat Cell Biol.* 2:797-804.
- Chia, W., R. Kraut, P. Li, X. Yang, and M. Zavortink.** 1997. On the roles of inscuteable in asymmetric cell divisions in Drosophila. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 62:79-87.
- Clerot, J.C.** 1971. [Intercellular bridges in the testis of Gardonus: syncitial organization and synchrony in the differentiation of germ cells]. *J Ultrastruct Res.* 37:690-703.
- Cleveland, L.R.** 1954. Hormone-Induced sexual cycles in flagelates. XI. Reorganization in the zygote of Barbulonympha without nuclear or cytoplasmic division. *J. Morphol.* 95:189-212.
- Cleveland, L.R.** 1963. Function of flagellate and other centrioles in cell reproduction. In *The Cell in Mitosis*. Levine, editor. Academic Press, New York et Londres. 3-53.
- Clute, P., and J. Pines.** 1999. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol.* 1:82-87.
- Connolly, J.A., and V.I. Kalnins.** 1978. Visualization of centrioles and basal bodies by fluorescent staining with nonimmune rabbit sera. *J Cell Biol.* 79:526-32.
- Cortez, D., and S.J. Elledge.** 2000. Conducting the mitotic symphony. *Nature.* 406:354-6.
- Cuif, M.H., F. Possmayer, H. Zander, N. Bordes, F. Jollivet, A. Couedel-Courteille, I. Janoueix-Lerosey, G. Langsley, M. Bornens, and B. Goud.** 1999. Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *Embo J.* 18:1772-82.
- Dadoue, J.P., M.F. Alfonsi, and M.A. Fain-Maurel.** 1987. [Ultrastructural labeling of the chromatoid body and the centriole-associated body using the DNase-gold colloidal complex in monkey spermatids]. *C R Acad Sci III.* 305:135-40.
- Danowski, B.A.** 1989. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J Cell Sci.* 93:255-66.
- De Brabander, M., G. Geuens, R. Nuydens, R. Willebrords, and J. De Mey.** 1982. Microtubule stability and assembly in living cells: the influence of metabolic inhibitors, taxol and pH. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 46:227-40.
- de Saint Phalle, B., and W. Sullivan.** 1998. Spindle assembly and mitosis without centrosomes in parthenogenetic Sciara embryos. *J Cell Biol.* 141:1383-91.
- Debec, A., and C. Abbadie.** 1989. The acentriolar state of the Drosophila cell lines 1182. *Biol Cell.* 67:307-11.
- Debec, A., C. Detraves, C. Montmory, G. Geraud, and M. Wright.** 1995. Polar organization of gamma-tubulin in acentriolar mitotic spindles of Drosophila melanogaster cells. *J Cell Sci.* 108:2645-53.

- Debec, A., C. Marcaillou, Y. Bobinsec, and C. Borot.** 1999. The centrosome cycle in syncytial *Drosophila* embryos analyzed by energy filtering transmission electron microscopy. *Biol Cell*. 91:379-91.
- Deng, C.X., and S.G. Brodie.** 2000. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays*. 22:728-37.
- Desai, A., and T.J. Mitchison.** 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:83-117.
- Desai, A., S. Verma, T.J. Mitchison, and C.E. Walczak.** 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*. 96:69-78.
- Dictenberg, J.B., W. Zimmerman, C.A. Sparks, A. Young, C. Vidair, Y. Zheng, W. Carrington, F.S. Fay, and S.J. Doxsey.** 1998. Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol*. 141:163-74.
- Dirksen, E.R.** 1991. Centriole and basal body formation during ciliogenesis revisited. *Biol Cell*. 72:31-8.
- Dirksen, E.R., and T.T. Crocker.** 1966. Centriole replication in differentiating ciliated cells of mammalian respiratory epithelium. *J. Microscopy*. 5:629-644.
- Diviani, D., L.K. Langeberg, S.J. Doxsey, and J.D. Scott.** 2000. Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain. *Curr Biol*. 10:417-20.
- Diviani, D., and J.D. Scott.** 2001. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J Cell Sci*. 114:1431-7.
- Dogterom, M., M.A. Felix, C.C. Guet, and S. Leibler.** 1996. Influence of M-phase chromatin on the anisotropy of microtubule asters. *J Cell Biol*. 133:125-140.
- Donaldson, A.D., and J.V. Kilmartin.** 1996. Spc42p: A phosphorylated component of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *J Cell Biol*. 132:887-901.
- Doxsey, S.** 2001. Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:688-98.
- Drewes, G., A. Ebnet, and E.M. Mandelkow.** 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci*. 23:307-11.
- Duensing, S., A. Duensing, C.P. Crum, and K. Munger.** 2001. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res*. 61:2356-60.
- Duensing, S., L.Y. Lee, A. Duensing, J. Basile, S. Piboonyiom, S. Gonzalez, C.P. Crum, and K. Munger.** 2000. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:10002-7.
- Dujardin, D., U.I. Wacker, A. Moreau, T.A. Schroer, J.E. Rickard, and J.R. De Mey.** 1998. Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol*. 141:849-62.
- Duke, T.A., and D. Bray.** 1999. Heightened sensitivity of a lattice of membrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:10104-8.
- Dunn, G.A., D. Zicha, and P.E. Fraylich.** 1997. Rapid, microtubule-dependent fluctuations of the cell margin. *J Cell Sci*. 110:3091-8.
- Dustin, P.** 1978. chapitre 4. In *Microtubules*. Springer-Verlag, Heidelberg et New York.
- Dutcher, S.K.** 1995. Purification of basal bodies and basal body complexes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Cell Biol*. 47:323-34.
- Dutcher, S.K.** 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol*. 13:49-54.

- Dutcher, S.K., and E.C. Trabuco.** 1998. The UNI3 gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes delta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Mol Biol Cell.* 9:1293-1308.
- Dziewanowski, M.A., M.J. DeStefano, and M. Rabinovitch.** 1980. Effect of antitubulins on spontaneous and chemotactic migration of neutrophils under agarose. *J Cell Sci.* 42:379-88.
- Edde, B., J. Rossier, J.P. Le Caer, Y. Berwald-Netter, A. Koulakoff, F. Gros, and P. Denoulet.** 1991. A combination of posttranslational modifications is responsible for the production of neuronal alpha-tubulin heterogeneity. *J Cell Biochem.* 46:134-42.
- Ehler, L.L., J.A. Holmes, and S.K. Dutcher.** 1995. Loss of spatial control of the mitotic spindle apparatus in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking basal bodies. *Genetics.* 141:945-60.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl.** 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494-8.
- Elbaum, M., A. Chausovsky, E.T. Levy, M. Shtutman, and A.D. Bershadsky.** 1999. Microtubule involvement in regulating cell contractility and adhesion-dependent signalling: a possible mechanism for polarization of cell motility. *Biochem Soc Symp.* 65:147-72.
- Emoto, K., and M. Umeda.** 2000. An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *J Cell Biol.* 149:1215-24.
- Enomoto, T.** 1996. Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct Funct.* 21:317-26.
- Erickson, H.P.** 1995. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell.* 80:367-70.
- Erickson, H.P.** 2000a. Dynamin and FtsZ. Missing links in mitochondrial and bacterial division. *J Cell Biol.* 148:1103-5.
- Erickson, H.P.** 2000b. Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament? *Nat Cell Biol.* 2:E93-6.
- Erickson, J.W., and R.A. Cerione.** 2001. Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 13:153-7.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa.** 1984. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature.* 310:58-61.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa.** 1985. Evidence for an involvement of actin in the positioning and motility of centrosomes. *J Cell Biol.* 101:96-103.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa.** 1992. Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J Cell Biol.* 116:1157-66.
- Evans, L., T. Mitchison, and M. Kirschner.** 1985. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol.* 100:1185-91.
- Fabunmi, R.P., W.C. Wigley, P.J. Thomas, and G.N. DeMartino.** 2000. Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J Biol Chem.* 275:409-13.
- Fanara, P., B. Oback, K. Ashman, A. Podtelejnikov, and R. Brandt.** 1999. Identification of MINUS, a small polypeptide that functions as a microtubule nucleation suppressor. *Embo J.* 18:565-77.
- Fawcett, D.W., and K.R. Porter.** 1954. A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J.Morphol.* 94:221-281.
- Feliciello, A., M.E. Gottesman, and E.V. Avvedimento.** 2001. The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol.* 308:99-114.



- Feng, Y., E.C. Olson, P.T. Stukenberg, L.A. Flanagan, M.W. Kirschner, and C.A. Walsh.** 2000. LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron*. 28:665-79.
- Field, C., R. Li, and K. Oegema.** 1999. Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol*. 11:68-80.
- Fisher, D., and K. Sawin.** 1998. Latex allergy in the primary care setting. *J Am Acad Nurse Pract*. 10:203-8.
- Fisk, H.A., and M. Winey.** 2001. The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell*. 106:95-104.
- Flavell, R.A., and I.G. Jones.** 1971. DNA from isolated pellicles of Tetrahymena. *J Cell Sci*. 9:719-26.
- Fouquet, J.P., B. Edde, M.L. Kann, A. Wolff, E. Desbruyeres, and P. Denoulet.** 1994. Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis. *Cell Motil Cytoskeleton*. 27:49-58.
- Francis, S.E., and T.N. Davis.** 2000. The spindle pole body of *Saccharomyces cerevisiae*: architecture and assembly of the core components. *Curr Top Dev Biol*. 49:105-32.
- Freed, E., K.R. Lacey, P. Huie, S.A. Lyapina, R.J. Deshaies, T. Stearns, and P.K. Jackson.** 1999. Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle. *Genes Dev*. 13:2242-57.
- Fry, A.M., T. Mayor, P. Meraldi, Y.D. Stierhof, K. Tanaka, and E.A. Nigg.** 1998. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol*. 141:1563-74.
- Fuller, S.D., B.E. Gowen, S. Reinsch, A. Sawyer, B. Buendia, R. Wepf, and E. Karsenti.** 1995. The core of the mammalian centriole contains gamma-tubulin. *Curr Biol*. 5:1384-93.
- Fulton, C.** 1971. Centrioles. In *Origin and Continuity of Cell Organelles*. Vol. 2. R.a. Uspring, editor. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York. 170221.
- Fulton, C., and A.D. Dingle.** 1971. Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*. *J Cell Biol*. 51:826-36.
- Gall, J.C.** 1961. Centriole replication. A study of spermatogenesis in the snail, *Viviparus*. *J. biophys. biochem. Cytol*. 10:163-193.
- Gallant, P., and E.A. Nigg.** 1992. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol*. 117:213-24.
- Gard, D.L., S. Hafezi, T. Zhang, and S.J. Doxsey.** 1990. Centrosome duplication continues in cycloheximide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle. *J Cell Biol*. 110:2033-42.
- Garreau de Loubresse, N., C. Klotz, B. Vignes, J. Rutin, and J. Beisson.** 1991. Ca<sup>2+</sup>-binding proteins and contractility of the infraciliary lattice in *Paramecium*. *Biology of the Cell*. 71:217-225.
- Garreau De Loubresse, N., F. Ruiz, J. Beisson, and C. Klotz.** 2001. Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies. *BMC Cell Biol*. 2:4.
- Garrington, T.P., and G.L. Johnson.** 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 11:211-8.
- Geiger, B., and A. Bershadsky.** 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol*. 13:584-92.
- Geimer, S., A. Teltenkötter, U. Plessmann, K. Weber, and K.F. Lehtreck.** 1997. Purification and characterization of basal apparatuses from a flagellate green alga. *Cell Motil Cytoskeleton*. 37:72-85.

- Geiser, J.R., H.A. Sundberg, B.H. Chang, E.G. Muller, and T.N. Davis.** 1993. The essential mitotic target of calmodulin is the 110-kilodalton component of the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology*. 13:7913-24.
- Giansanti, M.G., M. Gatti, and S. Bonaccorsi.** 2001. The role of centrosomes and astral microtubules during asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts. *Development*. 128:1137-45.
- Gibbons, B.H., and I.R. Gibbons.** 1973. The effect of partial extraction of dynein arms on the movement of reactivated sea-urchin sperm. *J Cell Sci*. 13:337-57.
- Gibbons, I.R., and A.J. Rowe.** 1965. Dynein : a protein with adenosin triphosphate activity from cilia. *Science*. 149:424.
- Gillingham, A.K., and S. Munro.** 2000. The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep*. 1:524-9.
- Girbardt, M., and H. Hadrich.** 1975. [Ultrastructure of the fungal nucleus. III. Genesis of the nucleus-associated organelle (NAO equals "KCE")]. *Z Allg Mikrobiol*. 15:157-73.
- Goepfert, T.M., and B.R. Brinkley.** 2000. The centrosome-associated Aurora/Ipl-like kinase family. *Curr Top Dev Biol*. 49:331-42.
- Gonczy, P., H. Schnabel, T. Kaletta, A.D. Amores, T. Hyman, and R. Schnabel.** 1999. Dissection of cell division processes in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo by mutational analysis. *J Cell Biol*. 144:927-46.
- Gonzalez, C., R.D. Saunders, J. Casal, I. Molina, M. Carmena, P. Ripoll, and D.M. Glover.** 1990. Mutations at the *asp* locus of *Drosophila* lead to multiple free centrosomes in syncytial embryos, but restrict centrosome duplication in larval neuroblasts. *J Cell Sci*. 96:605-16.
- Goode, B.L., D.G. Drubin, and G. Barnes.** 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol*. 12:63-71.
- Gordon, M.B., L. Howard, and D.A. Compton.** 2001. Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J Cell Biol*. 152:425-34.
- Gorgidze, L.A., and I.A. Vorobjev.** 1995. Centrosome and microtubules behavior in the cytoplasts. *Journal of Submicroscopic Cytology & Pathology*. 27:381-9.
- Gotlieb, A.I., L.M. May, L. Subrahmanyam, and V.I. Kalnins.** 1981. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J Cell Biol*. 91:589-94.
- Gotta, M., M.C. Abraham, and J. Ahringer.** 2001. CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol*. 11:482-8.
- Gould, R.R., and G.G. Borisy.** 1977. The pericentriolar material in Chinese Hamster ovary cells nucleates microtubules formation. *J. Cell Biol*. 73:601-615.
- Graf, R., N. Brusis, C. Daunderer, U. Euteneuer, A. Hestermann, M. Schliwa, and M. Ueda.** 2000. Comparative structural, molecular, and functional aspects of the *Dictyostelium discoideum* centrosome. *Curr Top Dev Biol*. 49:161-85.
- Grigoriev, I.S., A.A. Chernobelskaya, and I.A. Vorobjev.** 1999. Nocodazole, vinblastine and taxol at low concentrations affect fibroblast locomotion and saltatory movements of organelles. *Membr Cell Biol*. 13:23-48.
- Grill, S.W., P. Gonczy, E.H. Stelzer, and A.A. Hyman.** 2001. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*. 409:630-3.
- Gruss, O.J., R.E. Carazo-Salas, C.A. Schatz, G. Guarguaglini, J. Kast, M. Wilm, N. Le Bot, I. Vernos, E. Karsenti, and I.W. Mattaj.** 2001. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*. 104:83-93.

- Gstaiger, M., A. Marti, and W. Krek.** 1999. Association of human SCF(SKP2) subunit p19(SKP1) with interphase centrosomes and mitotic spindle poles. *Exp Cell Res.* 247:554-62.
- Gunawardane, R.N., S.B. Lizarraga, C. Wiese, A. Wilde, and Y. Zheng.** 2000. gamma-Tubulin complexes and their role in microtubule nucleation. *Curr Top Dev Biol.* 49:55-73.
- Gundersen, G.G., I. Kim, and C.J. Chapin.** 1994. Induction of stable microtubules in 3T3 fibroblasts by TGF-beta and serum. *J Cell Sci.* 107:645-59.
- Guo, M., and B.A. Hay.** 1999. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 11:745-52.
- Haimo, L.T.** 1997. Ordering microtubules. *Bioessays.* 19:547-50.
- Hales, K.G., E. Bi, J.Q. Wu, J.C. Adam, I.C. Yu, and J.R. Pringle.** 1999. Cytokinesis: an emerging unified theory for eukaryotes? *Curr Opin Cell Biol.* 11:717-25.
- Hall, J.L., Z. Ramanis, and D.J. Luck.** 1989. Basal body/centriolar DNA: molecular genetic studies in *Chlamydomonas*. *Cell.* 59:121-32.
- Hartman, H.** 1975. The centriole and the cell. *J Theor Biol.* 51:501-9.
- Hartwell, L.** 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell.* 71:543-6.
- Hartwell, L.H.** 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev.* 38:164-98.
- Hartwell, L.H., and T.A. Weinert.** 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246:629-34.
- Hayashi, M., T. Yagi, K. Yoshimura, and R. Kamiya.** 1998. Real-time observation of Ca<sup>2+</sup>-induced basal body reorientation in *Chlamydomonas*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 41:49-56.
- Heald, R., R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti.** 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature.* 382:420-5.
- Heald, R., R. Tournebize, A. Habermann, E. Karsenti, and A. Hyman.** 1997. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol.* 138:615-28.
- Heath, B.** 1980. Variant Mitosis in Lower Eukaryotes: Indicators of the Evolution of Mitosis? *International review of cytology.* 64:1-78.
- Heidemann, S.R., and M.W. Kirschner.** 1975. Aster formation in eggs of *Xenopus laevis*. Induction by isolated basal bodies. *J Cell Biol.* 67:105-17.
- Heidemann, S.R., and J.R. McIntosh.** 1980. Visualization of the structural polarity of microtubules. *Nature.* 286:517-9.
- Heidemann, S.R., G. Sander, and M.W. Kirschner.** 1977. Evidence for a functional role of RNA in centrioles. *Cell.* 10:337-50.
- Heidemann, S.R., G.W. Zieve, and J.R. McIntosh.** 1980. Evidence for microtubule subunit addition to the distal end of mitotic structures in vitro. *J Cell Biol.* 87:152-9.
- Helfman, D.M., E.T. Levy, C. Berthier, M. Shtutman, D. Riveline, I. Grosheva, A. Lachish-Zalait, M. Elbaum, and A.D. Bershadsky.** 1999. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol Biol Cell.* 10:3097-112.
- Henderson, C.G., J.B. Tucker, M.A. Chaplin, J.B. Mackie, S.N. Maidment, M.M. Mogensen, and C.C. Paton.** 1994. Reorganization of the centrosome and associated microtubules during the morphogenesis of a mouse cochlear epithelial cell. *J Cell Sci.* 107:589-600.
- Hill, E., M. Clarke, and F.A. Barr.** 2000. The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *Embo J.* 19:5711-9.

- Hinchcliffe, E.H., G.O. Cassels, C.L. Rieder, and G. Sluder.** 1998. The coordination of centrosome reproduction with nuclear events of the cell cycle in the sea urchin zygote. *J Cell Biol.* 140:1417-26.
- Hinchcliffe, E.H., C. Li, E.A. Thompson, J.L. Maller, and G. Sluder.** 1999. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science.* 283:851-4.
- Hinchcliffe, E.H., F.J. Miller, M. Cham, A. Khodjakov, and G. Sluder.** 2001. Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science.* 291:1547-50.
- Hinchcliffe, E.H., and G. Sluder.** 2001. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* 15:1167-81.
- Holmes, J.A., and S.K. Dutcher.** 1989. Cellular asymmetry in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Sci.* 94:273-85.
- Holy, J., and G. Schatten.** 1991. Differential behavior of centrosomes in unequally dividing blastomeres during fourth cleavage of sea urchin embryos. *J Cell Sci.* 98:423-31.
- Holy, T.E., M. Dogterom, B. Yurke, and S. Leibler.** 1997. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:6228-6231.
- Howell, B.J., D.B. Hoffman, G. Fang, A.W. Murray, and E.D. Salmon.** 2000. Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J Cell Biol.* 150:1233-50.
- Huang, B., A. Mengersen, and V.D. Lee.** 1988. Molecular cloning of cDNA for caltractin, a basal body-associated Ca<sup>2+</sup>-binding protein: homology in its protein sequence with calmodulin and the yeast CDC31 gene product. *J Cell Biol.* 107:133-40.
- Huang, B., Z. Ramanis, S.K. Dutcher, and D.J. Luck.** 1982. Uniflagellar mutants of *Chlamydomonas*: evidence for the role of basal bodies in transmission of positional information. *Cell.* 29:745-53.
- Huang, J.Y., and J.W. Raff.** 1999. The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in *Drosophila* cells. *Embo J.* 18:2184-2195.
- Hunter, A.W., and L. Wordeman.** 2000. How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci.* 113:4379-89.
- Hyams, J.S., and G.G. Borisy.** 1978. Isolated flagellar apparatus of *Chlamydomonas*: characterization of forward swimming and alteration of waveform and reversal of motion by calcium ions in vitro. *J Cell Sci.* 33:235-53.
- Hyman, A.A.** 2000. Centrosomes: Sic transit gloria centri. *Curr Biol.* 10:R276-8.
- Hyman, A.A., and E. Karsenti.** 1996. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell.* 84:401-10.
- Infante, C., F. Ramos-Morales, C. Fedriani, M. Bornens, and R.M. Rios.** 1999. GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J Cell Biol.* 145:83-98.
- Ivanovska, I., and M.D. Rose.** 2001. Fine structure analysis of the yeast centrin, Cdc31p, identifies residues specific for cell morphology and spindle pole body duplication. *Genetics.* 157:503-18.
- Jacobs, C., I.J. Domian, J.R. Maddock, and L. Shapiro.** 1999. Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell.* 97:111-20.
- Job, D., C.T. Rauch, E.H. Fischer, and R.L. Margolis.** 1982. Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry.* 21:509-15.

- Johnson, K.A., and J.L. Rosenbaum.** 1990. The basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* do not contain immunologically detectable DNA. *Cell*. 62:615-9.
- Kalab, P., R.T. Pu, and M. Dasso.** 1999. The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol*. 9:481-4.
- Kaltschmidt, J.A., C.M. Davidson, N.H. Brown, and A.H. Brand.** 2000. Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol*. 2:7-12.
- Kapoor, T.M., T.U. Mayer, M.L. Coughlin, and T.J. Mitchison.** 2000. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol*. 150:975-88.
- Karsenti, E., J. Newport, R. Hubble, and M. Kirschner.** 1984a. Interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays, as studied by the injection of centrosomes and nuclei into *Xenopus* eggs. *J Cell Biol*. 98:1730-45.
- Karsenti, E., J. Newport, and M. Kirschner.** 1984b. Respective roles of centrosomes and chromatin in the conversion of microtubule arrays from interphase to metaphase. *J Cell Biol*. 99:47s-54s.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, M. Gimona, K. Beningo, Y.L. Wang, and J.V. Small.** 2000. Enforced polarisation and locomotion of fibroblasts lacking microtubules. *Curr Biol*. 10:739-42.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small.** 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol*. 146:1033-44.
- Kaverina, I., K. Rottner, and J.V. Small.** 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol*. 142:181-90.
- Kay, A.J., and C.P. Hunter.** 2001. CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr Biol*. 11:474-81.
- Keating, T.J., and G.G. Borisy.** 1999. Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biol Cell*. 91:321-9.
- Keating, T.J., and G.G. Borisy.** 2000. Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*. 2:352-7.
- Keating, T.J., J.G. Peloquin, V.I. Rodionov, D. Momcilovic, and G.G. Borisy.** 1997. Microtubule release from the centrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5078-83.
- Keller, H.U., A. Naef, and A. Zimmermann.** 1984. Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Cell Res*. 153:173-85.
- Keryer, G., R.M. Rios, B.F. Landmark, B. Skalhegg, S.M. Lohmann, and M. Bornens.** 1993. A high-affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP- dependent protein kinase II in the centrosome of human cells. *Exp Cell Res*. 204:230-40.
- Keryer, G., H. Ris, and G.G. Borisy.** 1984. Centriole distribution during tripolar mitosis in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol*. 98:2222-9.
- Keryer, G., B.S. Skalhegg, B.F. Landmark, V. Hansson, T. Jahnsen, and K. Tasken.** 1999. Differential localization of protein kinase A type II isozymes in the Golgi-centrosomal area. *Exp Cell Res*. 249:131-46.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, B.R. Oakley, and C.L. Rieder.** 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol*. 10:59-67.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, and C.L. Rieder.** 1997. A synergy of technologies: combining laser microsurgery with green fluorescent protein tagging. *Cell Motil Cytoskeleton*. 38:311-7.
- Khodjakov, A., and C.L. Rieder.** 1999. The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J Cell Biol*. 146:585-96.

- Khodjakov, A., and C.L. Rieder.** 2001. Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol.* 153:237-42.
- King, J.M., T.S. Hays, and R.B. Nicklas.** 2000. Dynein is a transient kinetochore component whose binding is regulated by microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol.* 151:739-48.
- Kirschner, M., and T. Mitchison.** 1986a. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell.* 45:329-42.
- Kirschner, M., and E. Schulze.** 1986. Morphogenesis and the control of microtubule dynamics in cells. *J Cell Sci Suppl.* 5:293-310.
- Kirschner, M.W., and T. Mitchison.** 1986b. Microtubule dynamics. *Nature.* 324:621.
- Klink, V.P., and S.M. Wolniak.** 2001. Centrin is necessary for the formation of the motile apparatus in spermatids of Marsilea. *Mol Biol Cell.* 12:761-76.
- Klotz, C., M.C. Dabauvalle, M. Paintrand, T. Weber, M. Bornens, and E. Karsenti.** 1990. Parthenogenesis in *Xenopus* eggs requires centrosomal integrity. *J Cell Biol.* 110:405-15.
- Klotz, C., N. Garreau de Loubresse, F. Ruiz, and J. Beisson.** 1997. Genetic evidence for a role of centrin-associated proteins in the organization and dynamics of the infraciliary lattice in *Paramecium*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38:172-86.
- Kochanski, R.S., and G.G. Borisy.** 1990. Mode of centriole duplication and distribution. *J Cell Biol.* 110:1599-605.
- Koonce, M.P., R.A. Cloney, and M.W. Berns.** 1984. Laser irradiation of centrosomes in newt eosinophils: evidence of centriole role in motility. *Journal of Cell Biology.* 98:1999-2010.
- Koonce, M.P., J. Kohler, R. Neujahr, J.M. Schwartz, I. Tikhonenko, and G. Gerisch.** 1999. Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *Embo J.* 18:6786-6792.
- Korinek, W.S., M.J. Copeland, A. Chaudhuri, and J. Chant.** 2000. Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science.* 287:2257-9.
- Kubai, D.F.** 1975. The evolution of the mitotic spindle. *Int Rev Cytol.* 43:167-227.
- Kuntziger, T., and M. Bornens.** 2000. The centrosome and parthenogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 49:1-25.
- Kuntziger, T., O. Gavet, V. Manceau, A. Sobel, and M. Bornens.** 2001a. Stathmin/Op18 phosphorylation is regulated by microtubule assembly. *Mol Biol Cell.* 12:437-48.
- Kuntziger, T., O. Gavet, A. Sobel, and M. Bornens.** 2001b. Differential effect of two stathmin/Op18 phosphorylation mutants on *Xenopus* embryo development. *J Biol Chem.* 276:22979-84.
- Kuriyama, R.** 1984. Activity and stability of centrosomes in Chinese hamster ovary cells in nucleation of microtubules in vitro. *J Cell Sci.* 66:277-95.
- Kuriyama, R., and G.G. Borisy.** 1981a. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J Cell Biol.* 91:814-21.
- Kuriyama, R., and G.G. Borisy.** 1981b. Microtubule-nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle. *J Cell Biol.* 91:822-6.
- Kuriyama, R., and H. Kanatani.** 1981. The centriolar complex isolated from starfish spermatozoa. *J Cell Sci.* 49:33-49.
- Lacey, K.R., P.K. Jackson, and T. Stearns.** 1999. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2817-22.
- Lambert, A.M.** 1993. Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr Opin Cell Biol.* 5:116-22.

- Lange, B.M., A.J. Faragher, P. March, and K. Gull.** 2000. Centriole duplication and maturation in animal cells. *Curr Top Dev Biol.* 49:235-49.
- Lange, B.M., and K. Gull.** 1995. A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J Cell Biol.* 130:919-27.
- Laoukili, J., E. Perret, S. Middendorp, O. Houcine, C. Guennou, F. Marano, M. Bornens, and F. Tournier.** 2000. Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. *J Cell Sci.* 113:1355-64.
- Larcher, J.C., D. Boucher, S. Lazereg, F. Gros, and P. Denoulet.** 1996. Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J Biol Chem.* 271:22117-24.
- Larsson, M., J. Norrander, S. Graslund, E. Brundell, R. Linck, S. Stahl, and C. Hoog.** 2000. The spatial and temporal expression of Tekt1, a mouse tektin C homologue, during spermatogenesis suggest that it is involved in the development of the sperm tail basal body and axoneme. *Eur J Cell Biol.* 79:718-25.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz.** 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84:359-69.
- Lauze, E., B. Stoelcker, F.C. Luca, E. Weiss, A.R. Schutz, and M. Winey.** 1995. Yeast spindle pole body duplication gene MPS1 encodes an essential dual specificity protein kinase. *Embo J.* 14:1655-63.
- Le Dizet, M., and G. Piperno.** 1995. The light chain p28 associates with a subset of inner dynein arm heavy chains in Chlamydomonas axonemes. *Mol. Biol. Cell.* 6:697-711.
- Lehtreck, K.F., and A. Grunow.** 1999. Evidence for a direct role of nascent basal bodies during spindle pole initiation in the green alga *Spermatozopsis similis*. *Protist.* 150:163-81.
- Lee, L., J.S. Tirnauer, J. Li, S.C. Schuyler, J.Y. Liu, and D. Pellman.** 2000. Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science.* 287:2260-2.
- Lee, M.J., F. Gergely, K. Jeffers, S.Y. Peak-Chew, and J.W. Raff.** 2001. Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nat Cell Biol.* 3:643-9.
- Leguy, R., R. Melki, D. Pantaloni, and M.F. Carrier.** 2000. Monomeric gamma-tubulin nucleates microtubules. *J Biol Chem.* 275:21975-80.
- Li, F., E.J. Ackermann, C.F. Bennett, A.L. Rothermel, J. Plescia, S. Tognin, A. Villa, P.C. Marchisio, and D.C. Altieri.** 1999. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol.* 1:461-6.
- Li, Q., D. Hansen, A. Killilea, H.C. Joshi, R.E. Palazzo, and R. Balczon.** 2001. Kendrin/pericentrin-B, a centrosome protein with homology to pericentrin that complexes with PCM-1. *J Cell Sci.* 114:797-809.
- Liao, G., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen.** 1995. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci.* 108:3473-83.
- Lingle, W.L., and J.L. Salisbury.** 2000. The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol.* 49:313-29.
- Llanos, R., V. Chevrier, M. Ronjat, P. Meurer-Grob, P. Martinez, R. Frank, M. Bornens, R.H. Wade, J. Wehland, and D. Job.** 1999. Tubulin binding sites on gamma-tubulin: identification and molecular characterization. *Biochemistry.* 38:15712-20.
- Losick, R., and L. Shapiro.** 1999. Changing views on the nature of the bacterial cell: from biochemistry to cytology. *J Bacteriol.* 181:4143-5.

- Lowndes, N.F., and J.R. Murguia.** 2000. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.* 10:17-25.
- Lu, B., T. Usui, T. Uemura, L. Jan, and Y.N. Jan.** 1999. Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Curr Biol.* 9:1247-50.
- Luck, D.J.** 1984. Genetic and biochemical dissection of the eucaryotic flagellum. *J Cell Biol.* 98:789-94.
- Luetjens, C.M., and A.W. Dorresteijn.** 1998. Dynamic changes of the microtubule system corresponding to the unequal and spiral cleavage modes in the embryo of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Mollusca, Bivalvia). *Zygote.* 6:239-48.
- Machesky, L.M., and R.H. Insall.** 1999. Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol.* 146:267-72.
- Malawista, S.E., and A. De Boisfleury Chevance.** 1982. The cytokineplast: purified, stable, and functional motile machinery from human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* 95:960-73.
- Malech, H.L., R.K. Root, and J.I. Gallin.** 1977. Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. *J Cell Biol.* 75:666-93.
- Maniotis, A., and M. Schliwa.** 1991. Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells. *Cell.* 67:495-504.
- Marshall, W.F., and J.L. Rosenbaum.** 2000. How centrioles work: lessons from green yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 12:119-25.
- Mascardo, R.N., and P. Sherline.** 1982. Somatostatin inhibits rapid centrosomal separation and cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Endocrinology.* 111:1394-6.
- Matsumoto, Y., K. Hayashi, and E. Nishida.** 1999. Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol.* 9:429-32.
- Maunoury, M.R.** 1978. [Immunocytochemical location of the centrosphere of human cancer cells using natural rabbit antibodies]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 286:503-6.
- Mayer, T.U., T.M. Kapoor, S.J. Haggarty, R.W. King, S.L. Schreiber, and T.J. Mitchison.** 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science.* 286:971-4.
- Mayor, T., Y.D. Stierhof, K. Tanaka, A.M. Fry, and E.A. Nigg.** 2000. The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J Cell Biol.* 151:837-46.
- Mays, R.W., K.A. Beck, and W.J. Nelson.** 1994. Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 6:16-24.
- Mazia, D.** 1961. . In *The Cell*. Vol. III. Bracket and Mirsky, editors. Academic Press, New York et Londres. 77-412.
- Mazia, D.** 1987. The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int Rev Cytol.* 100:49-92.
- Mazia, D., P.J. Harris, and T. Bidring.** 1960. The multiplicity of the mitotic centers and the time course of their duplication and separation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7:1-20.
- McCollum, D., and K.L. Gould.** 2001. Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell Biol.* 11:89-95.
- McEwen, B.F., G.K. Chan, B. Zubrowski, M.S. Savoian, M.T. Sauer, and T.J. Yen.** 2001. CENP-E Is Essential for Reliable Bioriented Spindle Attachment, but Chromosome Alignment Can Be Achieved via Redundant Mechanisms in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell.* 12:2776-89.



- McFadden, G.I., D. Schulze, B. Surek, J.L. Salisbury, and M. Melkonian.** 1987. Basal body reorientation mediated by a Ca<sup>2+</sup>-modulated contractile protein. *J Cell Biol.* 105:903-12.
- McNally, F.J., and S. Thomas.** 1998. Katanin is responsible for the M-phase microtubule-severing activity in *Xenopus* eggs. *Mol Biol Cell.* 9:1847-61.
- Meda, P., V. Chevrier, B. Edde, and D. Job.** 1997. Demonstration and analysis of tubulin binding sites on centrosomes. *Biochemistry.* 36:2550-8.
- Meek, D.W.** 2000. The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol Biol (Paris).* 48:246-54.
- Megraw, T.L., L.R. Kao, and T.C. Kaufman.** 2001. Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr Biol.* 11:116-20.
- Megraw, T.L., and T.C. Kaufman.** 2000. The centrosome in *Drosophila* oocyte development. *Curr Top Dev Biol.* 49:385-407.
- Megraw, T.L., K. Li, L.R. Kao, and T.C. Kaufman.** 1999. The centrosomin protein is required for centrosome assembly and function during cleavage in *Drosophila*. *Development.* 126:2829-39.
- Meindl, U.** 1983. Cytoskeletal Control of Nuclear Migration and Anchoring in Developing Cells of *Micrasterias denticulata* and the Change Caused by the Anti-Microtubular Harbicide Amiprophos-methyl (APM). *Protoplasma.* 118:75-90.
- Meindl, U.** 1985. Aberrant Nuclear Migration and Microtubule Arrangement in a Defect Mutant Cell of *Micrasterias thomasi*. *Protoplasma.* 126:74-90.
- Menssen, R., A. Neutzner, and W. Seufert.** 2001. Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis. *Curr Biol.* 11:345-50.
- Meraldi, P., J. Lukas, A.M. Fry, J. Bartek, and E.A. Nigg.** 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2- cyclin A. *Nat Cell Biol.* 1:88-93.
- Merdes, A., R. Heald, K. Samejima, W.C. Earnshaw, and D.W. Cleveland.** 2000. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J Cell Biol.* 149:851-62.
- Merdes, A., K. Ramyar, J.D. Vechio, and D.W. Cleveland.** 1996. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell.* 87:447-58.
- Middendorp, S., T. Kuntziger, Y. Abraham, S. Holmes, N. Bordes, M. Paintrand, A. Paoletti, and M. Bornens.** 2000. A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J Cell Biol.* 148:405-16.
- Mignot, J.P.** 1996a. The centrosomal big bang: From a unique central organelle towards a constellation of MTOCs. *Biol Cell.* 86:81-91.
- Mignot, J.P.** 1996b. [New hypothesis on the replication of centrioles and basal bodies]. *C R Acad Sci III.* 319:1093-9.
- Million, K., J. Larcher, J. Laoukili, D. Bourguignon, F. Marano, and F. Tournier.** 1999. Polyglutamylolation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells. *J Cell Sci.* 112:4357-66.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita.** 2000. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol.* 10:865-8.
- Mitchison, T., and M. Kirschner.** 1984a. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312:237-42.
- Mitchison, T., and M. Kirschner.** 1984b. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature.* 312:232-7.
- Mitchison, T.J., and M.W. Kirschner.** 1986. Isolation of mammalian centrosomes. *Methods Enzymol.* 134:261-8.

- Mizukami, I., and J. Gall.** 1966. Centriole replication. II. Sperm formation in the fern, Marsilea, and the cycad, Zamia. *J Cell Biol.* 29:97-111.
- Mogensen, M.M.** 1999. Microtubule release and capture in epithelial cells. *Biol Cell.* 91:331-41.
- Mogensen, M.M., A. Malik, M. Piel, V. Bouckson-Castaing, and M. Bornens.** 2000. Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J Cell Sci.* 113:3013-23.
- Moncrief, N.D., R.H. Kretzinger, and M. Goodman.** 1990. Evolution of EF-hand Calcium-modulated Proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evol.* 30:522-562.
- Moritz, M., M.B. Braunfeld, J.C. Fung, J.W. Sedat, B.M. Alberts, and D.A. Agard.** 1995a. Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early Drosophila embryos. *J Cell Biol.* 130:1149-59.
- Moritz, M., M.B. Braunfeld, V. Guenebaut, J. Heuser, and D.A. Agard.** 2000. Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat Cell Biol.* 2:365-70.
- Moritz, M., M.B. Braunfeld, J.W. Sedat, B. Alberts, and D.A. Agard.** 1995b. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature.* 378:638-40.
- Moudjou, M., N. Bordes, M. Paintrand, and M. Bornens.** 1996. gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J Cell Sci.* 109:875-87.
- Moudjou, M., M. Lanotte, and M. Bornens.** 1989. The fate of the centrosome-microtubule network in monocyte-derived giant cells. *J Cell Sci.* 94:237-44.
- Mountain, V., C. Simerly, L. Howard, A. Ando, G. Schatten, and D.A. Compton.** 1999. The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol.* 147:351-66.
- Moy, G.W., B. Brandriff, and V.D. Vacquier.** 1977. Cytasters from sea urchin eggs parthenogenetically activated by procaine. *J Cell Biol.* 73:788-93.
- Muhua, L., N.R. Adames, M.D. Murphy, C.R. Shields, and J.A. Cooper.** 1998. A cytokinesis checkpoint requiring the yeast homologue of an APC- binding protein. *Nature.* 393:487-91.
- Mullins, J.M., and J.J. Biesele.** 1977. Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol.* 73:672-84.
- Mullins, R.D.** 2000. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol.* 12:91-6.
- Murphy, S.M., L. Urbani, and T. Stearns.** 1998. The mammalian gamma-tubulin complex contains homologues of the yeast spindle pole body components spc97p and spc98p. *J Cell Biol.* 141:663-74.
- Murray, A.W.** 1992. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature.* 359:599-604.
- Muzio, M., B.R. Stockwell, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, and V.M. Dixit.** 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 273:2926-30.
- Nachury, M.V., T.J. Maresca, W.C. Salmon, C.M. Waterman-Storer, R. Heald, and K. Weis.** 2001. Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell.* 104:95-106.
- Nagano, H., S. Hirai, K. Okano, and S. Ikegami.** 1981. Achromosomal cleavage of fertilized starfish eggs in the presence of aphidicolin. *Dev Biol.* 85:409-15.
- Nagasaki, T., C.J. Chapin, and G.G. Gundersen.** 1992. Distribution of deetyrosinated microtubules in motile NRK fibroblasts is rapidly altered upon cell-cell contact: implications for contact inhibition of locomotion. *Cell Motil Cytoskeleton.* 23:45-60.

- Nakagawa, Y., Y. Yamane, T. Okanou, and S. Tsukita.** 2001. Outer dense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component preferentially associated with mother centrioles: its identification from isolated centrosomes. *Mol Biol Cell.* 12:1687-97.
- Nakayama, K., H. Nagahama, Y.A. Minamishima, M. Matsumoto, I. Nakamichi, K. Kitagawa, M. Shirane, R. Tsunematsu, T. Tsukiyama, N. Ishida, M. Kitagawa, and S. Hatakeyama.** 2000. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J.* 19:2069-81.
- Nedelec, F.J., T. Surrey, A.C. Maggs, and S. Leibler.** 1997. Self-organization of microtubules and motors. *Nature.* 389:305-8.
- Neujahr, R., R. Albrecht, J. Kohler, M. Matzner, J.M. Schwartz, M. Westphal, and G. Gerisch.** 1998. Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells. *J Cell Sci.* 111:1227-40.
- Ng, S.F., and J. Frankel.** 1977. 180 degrees rotation of ciliary rows and its morphogenetic implications in *Tetrahymena pyriformis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:1115-9.
- Nicklas, R.B., S.C. Ward, and G.J. Gorbsky.** 1995. Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J Cell Biol.* 130:929-39.
- Nigg, E.A., G. Schafer, H. Hilz, and H.M. Eppenberger.** 1985. Cyclic-AMP-dependent protein kinase type II is associated with the Golgi complex and with centrosomes. *Cell.* 41:1039-51.
- Nikolai, G., B. Niggemann, M. Werner, and K.S. Zanker.** 1999. Colcemid but not taxol modulates the migratory behavior of human T lymphocytes within 3-D collagen lattices. *Immunobiology.* 201:107-19.
- Nislow, C., V.A. Lombillo, R. Kuriyama, and J.R. McIntosh.** 1992. A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles. *Nature.* 359:543-7.
- Noireaux, V., R.M. Golsteyn, E. Friederich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and C. Sykes.** 2000. Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophys J.* 78:1643-54.
- Nonaka, S., Y. Tanaka, Y. Okada, S. Takeda, A. Harada, Y. Kanai, M. Kido, and N. Hirokawa.** 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell.* 95:829-37.
- Norrander, J., M. Larsson, S. Stahl, C. Hoog, and R. Linck.** 1998. Expression of ciliary tektins in brain and sensory development. *J Neurosci.* 18:8912-8.
- Nowell, P.C.** 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194:23-8.
- Oakley, B.R.** 2000a. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* 10:537-42.
- Oakley, B.R.** 2000b. gamma-Tubulin. *Curr Top Dev Biol.* 49:27-54.
- Oakley, C.E., and B.R. Oakley.** 1989. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature.* 338:662-4.
- O'Connell, C.B., and Y.L. Wang.** 2000. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol Biol Cell.* 11:1765-74.
- Oegema, K., and T.J. Mitchison.** 1997. Rappaport rules: cleavage furrow induction in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4817-20.
- Oegema, K., C. Wiese, O.C. Martin, R.A. Milligan, A. Iwamatsu, T.J. Mitchison, and Y. Zheng.** 1999. Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol.* 144:721-33.
- Ohi, R., and K.L. Gould.** 1999. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol.* 11:267-73.

- Okuda, M., H.F. Horn, P. Tarapore, Y. Tokuyama, A.G. Smulian, P.K. Chan, E.S. Knudsen, I.A. Hofmann, J.D. Snyder, K.E. Bove, and K. Fukasawa.** 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*. 103:127-40.
- Paintrand, M., M. Moudjou, H. Delacroix, and M. Bornens.** 1992. Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol*. 108:107-28.
- Palazzo, A.F., H.L. Joseph, Y. Chen, D.L. Dujardin, A.S. Alberts, K.K. Pfister, R.B. Vallee, and G.G. Gundersen.** 2001. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol*. 11:1536-41.
- Paoletti, A., and M. Bornens.** 1997. Organisation and functional regulation of the centrosome in animal cells. *Prog Cell Cycle Res*. 3:285-99.
- Paoletti, A., M. Moudjou, M. Paintrand, J.L. Salisbury, and M. Bornens.** 1996. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J Cell Sci*. 109:3089-102.
- Pepper, D.A., and B.R. Brinkley.** 1977. Localization of tubulin in the mitotic apparatus of mammalian cells by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Chromosoma*. 60:223-35.
- Pepper, D.A., and B.R. Brinkley.** 1979. Microtubule initiation at kinetochores and centrosomes in lysed mitotic cells. Inhibition of site-specific nucleation by tubulin antibody. *J Cell Biol*. 82:585-91.
- Pereira, G., T. Hofken, J. Grindlay, C. Manson, and E. Schiebel.** 2000. The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell*. 6:1-10.
- Pereira, G., and E. Schiebel.** 2001. The role of the yeast spindle pole body and the mammalian centrosome in regulating late mitotic events. *Curr. Op. in Cell Biol*.
- Pereira, G., T.U. Tanaka, K. Nasmyth, and E. Schiebel.** 2001. Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p/Bub2p checkpoint protein complex. *EMBO J*.
- Petersen, J., M.J. Heitz, and I.M. Hagan.** 1998. Conjugation in *S. pombe*: identification of a microtubule-organising centre, a requirement for microtubules and a role for Mad2. *Curr Biol*. 8:963-6.
- Phillips, D.M.** 1967. Giant centrioles formation in *Sciara*. *J. Cell Biol*. 33:73-92.
- Phillips, S.G., and J.B. Rattner.** 1976. Dependence of centriole formation on protein synthesis. *J Cell Biol*. 70:9-19.
- Picard, A., M.C. Harricane, J.C. Labbe, and M. Doree.** 1988. Germinal vesicle components are not required for the cell-cycle oscillator of the early starfish embryo. *Dev Biol*. 128:121-8.
- Picard, A., E. Karsenti, M.C. Dabauvalle, and M. Doree.** 1987. Release of mature starfish oocytes from interphase arrest by microinjection of human centrosomes. *Nature*. 327:170-2.
- Pickett-Heaps, J.D.** 1969. The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. *Cytobios*. 3:257-280.
- Piotrowska, K., and M. Zernicka-Goetz.** 2001. Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature*. 409:517-21.
- Popov, A.V., A. Pozniakovsky, I. Arnal, C. Antony, A.J. Ashford, K. Kinoshita, R. Tournebize, A.A. Hyman, and E. Karsenti.** 2001. XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains. *Embo J*. 20:397-410.
- Prokopenko, S.N., R. Saint, and H.J. Bellen.** 2000. Untying the Gordian knot of cytokinesis. Role of small G proteins and their regulators. *J Cell Biol*. 148:843-8.

- Pryzwansky, K.B., M. Schliwa, and K.R. Porter.** 1983. Comparison of the three-dimensional organization of unextracted and Triton-extracted human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Cell Biol.* 30:112-25.
- Purohit, A., G.A. Pihan, and S.J. Doxsey.** 2001. Methods for the study of pericentrin in centrosome assembly and function. *Methods Cell Biol.* 67:53-69.
- Quarmby, L.** 2000. Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J Cell Sci.* 113:2821-7.
- Quintyne, N.J., S.R. Gill, D.M. Eckley, C.L. Crego, D.A. Compton, and T.A. Schroer.** 1999. Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J Cell Biol.* 147:321-34.
- Raff, J.W., and D.M. Glover.** 1988. Nuclear and cytoplasmic mitotic cycles continue in *Drosophila* embryos in which DNA synthesis is inhibited with aphidicolin. *J Cell Biol.* 107:2009-19.
- Raff, J.W., and D.M. Glover.** 1989. Centrosomes, and not nuclei, initiate pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell.* 57:611-9.
- Raich, W.B., A.N. Moran, J.H. Rothman, and J. Hardin.** 1998. Cytokinesis and midzone microtubule organization in *Caenorhabditis elegans* require the kinesin-like protein ZEN-4. *Mol Biol Cell.* 9:2037-49.
- Raikov, I.B.** 1994. The Diversity of Forms of Mitosis in Protozoa: a Comparative Review. *Europ. J. Protistol.* 30:253-269.
- Rappaport, R.** 1971. Cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol.* 31:169-213.
- Rappaport, R.** 1985. Repeated furrow formation from a single mitotic apparatus in cylindrical sand dollar eggs. *J Exp Zool.* 234:167-71.
- Rappaport, R.** 1986. Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol.* 105:245-81.
- Rappaport, R.** 1997. Cleavage furrow establishment by the moving mitotic apparatus. *Dev Growth Differ.* 39:221-6.
- Rappaport, R., and B.N. Rappaport.** 1974. Establishment of cleavage furrows by the mitotic spindle. *J Exp Zool.* 189:189-96.
- Rattner, J.B., and B.R. Brinkley.** 1972. Ultrastructure of mammalian spermiogenesis. 3. The organization and morphogenesis of the manchette during rodent spermiogenesis. *J Ultrastruct Res.* 41:209-18.
- Rattner, J.B., and S.G. Phillips.** 1973. Independence of centriole formation and DNA synthesis. *J Cell Biol.* 57:359-72.
- Riabowol, K., G. Draetta, L. Brizuela, D. Vandre, and D. Beach.** 1989. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell.* 57:393-401.
- Rich, A.M., and S.T. Hoffstein.** 1981. Inverse correlation between neutrophil microtubule numbers and enhanced random migration. *J Cell Sci.* 48:181-91.
- Rieder, C.L., and R. Cole.** 2000. Microtubule disassembly delays the G2-M transition in vertebrates. *Curr Biol.* 10:1067-70.
- Rieder, C.L., S. Faruki, and A. Khodjakov.** 2001. The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol.* 11:413-9.
- Ring, D., R. Hubble, and M. Kirschner.** 1982. Mitosis in a cell with multiple centrioles. *J Cell Biol.* 94:549-56.
- Rinnerthaler, G., B. Geiger, and J.V. Small.** 1988. Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membrane ruffles and microtubules. *J Cell Biol.* 106:747-60.
- Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky.** 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally

- applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153:1175-86.
- Roberts, R.L., J. Nath, M.M. Friedman, and J.I. Gallin.** 1982. Effects of taxol on human neutrophils. *J Immunol.* 129:2134-41.
- Robinow, C.F., and J. Marak.** 1966. A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *J Cell Biol.* 29:129-51.
- Robinson, D.N., and J.A. Spudich.** 2000. Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 10:228-37.
- Robson, S.J., and R.D. Burgoyne.** 1989. Differential localisation of tyrosinated, detyrosinated, and acetylated alpha-tubulins in neurites and growth cones of dorsal root ganglion neurons. *Cell Motil Cytoskeleton.* 12:273-82.
- Rodionov, V., E. Nadezhdina, and G. Borisy.** 1999. Centrosomal control of microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:115-20.
- Rodionov, V.I., and G.G. Borisy.** 1997. Self-centring activity of cytoplasm. *Nature.* 386:170-3.
- Rogers, K.A., N.H. McKee, and V.I. Kalnins.** 1985. Preferential orientation of centrioles toward the heart in endothelial cells of major blood vessels is reestablished after reversal of a segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:3272-6.
- Roobol, A., J.C. Havercroft, and K. Gull.** 1982. Microtubule nucleation by the isolated microtubule-organizing centre of *Physarum polycephalum myxamoebae*. *J Cell Sci.* 55:365-81.
- Roos, U.P.** 1975. Mitosis in the cellular slime mold *Polysphondylium violaceum*. *J Cell Biol.* 64:480-91.
- Rosania, G.R., and J.A. Swanson.** 1996. Microtubules can modulate pseudopod activity from a distance inside macrophages. *Cell Motil Cytoskeleton.* 34:230-45.
- Rose, M.D., and G.R. Fink.** 1987. KAR1, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell.* 48:1047-60.
- Rosenbaum, J.** 2000. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr Biol.* 10:R801-3.
- Rothwell, W.F., P. Fogarty, C.M. Field, and W. Sullivan.** 1998. Nuclear-fallout, a *Drosophila* protein that cycles from the cytoplasm to the centrosomes, regulates cortical microfilament organization. *Development.* 125:1295-303.
- Rudd, C.E., K.A. Rogers, D.L. Brown, and J.G. Kaplan.** 1979. Microtubules, colchicine, and lymphocyte blastogenesis. *Can J Biochem.* 57:673-83.
- Ruiz, F., J. Beisson, J. Rossier, and P. Dupuis-Williams.** 1999. Basal body duplication in *Paramecium* requires gamma-tubulin. *Curr Biol.* 9:43-6.
- Ruiz, F., A. Krzywicka, C. Klotz, A. Keller, J. Cohen, F. Koll, G. Balavoine, and J. Beisson.** 2000. The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, eta-tubulin. *Curr Biol.* 10:1451-4.
- Salisbury, J.L., A. Baron, B. Surek, and M. Melkonian.** 1984. Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *J Cell Biol.* 99:962-70.
- Salisbury, J.L., A.T. Baron, D.E. Coling, V.E. Martindale, and M.A. Sanders.** 1986. Calcium-modulated contractile proteins associated with the eucaryotic centrosome. *Cell Motil Cytoskeleton.* 6:193-7.
- Salisbury, J.L., A.T. Baron, and M.A. Sanders.** 1988. The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. *Journal of Cell Biology.* 107:635-41.
- Salisbury, J.L., and G.L. Floyd.** 1978. Calcium-induced contraction of the rhizoplast of a quadriflagellate green alga. *Science.* 202:975-977.

- Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M.J. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune.** 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron*. 28:681-96.
- Savoian, M.S., W.C. Earnshaw, A. Khodjakov, and C.L. Rieder.** 1999. Cleavage furrows formed between centrosomes lacking an intervening spindle and chromosomes contain microtubule bundles, INCENP, and CHO1 but not CENP-E. *Mol Biol Cell*. 10:297-311.
- Saxton, W.M., D.L. Stemple, R.J. Leslie, E.D. Salmon, M. Zavortink, and J.R. McIntosh.** 1984. Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J Cell Biol*. 99:2175-86.
- Schatten, G.** 1982. Motility during fertilization. *Int Rev Cytol*. 79:59-163.
- Schiebel, E.** 2000. gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*. 12:113-8.
- Schiebel, E., and M. Bornens.** 1995. In search of a function for centrins. *Trends in Cell Biol*. 5:197-201.
- Schliwa, M., U. Euteneuer, R. Graf, and M. Ueda.** 1999. Centrosomes, microtubules and cell migration. *Biochem Soc Symp*. 65:223-31.
- Schliwa, M., K.B. Pryzwansky, and G.G. Borisy.** 1983. Tumor promoter-induced centrosome splitting in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Cell Biol*. 32:75-85.
- Schliwa, M., K.B. Pryzwansky, and U. Euteneuer.** 1982. Centrosome splitting in neutrophils: an unusual phenomenon related to cell activation and motility. *Cell*. 31:705-17.
- Schmidt, P.H., D.T. Dransfield, J.O. Claudio, R.G. Hawley, K.W. Trotter, S.L. Milgram, and J.R. Goldenring.** 1999. AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J Biol Chem*. 274:3055-66.
- Schnackenberg, B.J., A. Khodjakov, C.L. Rieder, and R.E. Palazzo.** 1998. The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:9295-300.
- Schroer, T.A.** 2001. Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr Opin Cell Biol*. 13:92-6.
- Schulze, E., and M. Kirschner.** 1986. Microtubule dynamics in interphase cells. *J Cell Biol*. 102:1020-31.
- Schuyler, S.C., and D. Pellman.** 2001. Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell*. 105:421-4.
- Schweitzer, I., and D.L. Brown.** 1984. Changes in organization and microtubule assembly activity of the centrosome during lymphocyte stimulation. *Biol Cell*. 52:147-59.
- Scolnick, D.M., and T.D. Halazonetis.** 2000. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*. 406:430-5.
- Seaman, G.R.** 1960. Large-scale isolation of kinetosomes from Tetrahymena. *Exp. Cell Res*. 21:292-302.
- Segal, M., and K. Bloom.** 2001. Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol*. 11:160-6.
- Sellitto, C., M. Kimble, and R. Kuriyama.** 1992. Heterogeneity of microtubule organizing center components as revealed by monoclonal antibodies to mammalian centrosomes and to nucleus-associated bodies from dictyostelium. *Cell Motil Cytoskeleton*. 22:7-24.
- Sellitto, C., and R. Kuriyama.** 1988. Distribution of a matrix component of the midbody during the cell cycle in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol*. 106:431-9.
- Shapiro, L., and R. Losick.** 1997. Protein localization and cell fate in bacteria. *Science*. 276:712-8.

- Shapiro, L., and R. Losick.** 2000. Dynamic spatial regulation in the bacterial cell. *Cell*. 100:89-98.
- Sharp, D.J., G.C. Rogers, and J.M. Scholey.** 2000. Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol*. 2:922-30.
- Sherline, P., and R. Mascardo.** 1982a. Epidermal growth factor-induced centrosomal separation: mechanism and relationship to mitogenesis. *J Cell Biol*. 95:316-22.
- Sherline, P., and R.N. Mascardo.** 1982b. Epidermal growth factor induces rapid centrosomal separation in HeLa and 3T3 cells. *J Cell Biol*. 93:507-12.
- Sherline, P., and R.N. Mascardo.** 1984. Co-ordinate control of centrosomal separation and DNA synthesis by growth regulators. *Exp Cell Res*. 153:109-20.
- Shimizu, T., R. Ishii, and H. Takahashi.** 1998. Unequal cleavage in the early *Tubifex* embryo. *Dev Growth Differ*. 40:257-66.
- Shimizu, T.S., N. Le Novere, M.D. Levin, A.J. Beavil, B.J. Sutton, and D. Bray.** 2000. Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis. *Nat Cell Biol*. 2:792-6.
- Sibon, O.C., A. Kelkar, W. Lemstra, and W.E. Theurkauf.** 2000. DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol*. 2:90-5.
- Sluder, G., and D.A. Begg.** 1985. Experimental analysis of the reproduction of spindle poles. *J Cell Sci*. 76:35-51.
- Sluder, G., and K. Lewis.** 1987. Relationship between nuclear DNA synthesis and centrosome reproduction in sea urchin eggs. *J Exp Zool*. 244:89-100.
- Sluder, G., F.J. Miller, K. Lewis, E.D. Davison, and C.L. Rieder.** 1989a. Centrosome inheritance in starfish zygotes: selective loss of the maternal centrosome after fertilization. *Dev Biol*. 131:567-79.
- Sluder, G., F.J. Miller, and C.L. Rieder.** 1986. The reproduction of centrosomes: nuclear versus cytoplasmic controls. *J Cell Biol*. 103:1873-81.
- Sluder, G., F.J. Miller, and C.L. Rieder.** 1989b. Reproductive capacity of sea urchin centrosomes without centrioles. *Cell Motil Cytoskeleton*. 13:264-73.
- Sluder, G., and C.L. Rieder.** 1985a. Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles. *J Cell Biol*. 100:887-96.
- Sluder, G., and C.L. Rieder.** 1985b. Experimental separation of pronuclei in fertilized sea urchin eggs: chromosomes do not organize a spindle in the absence of centrosomes. *J Cell Biol*. 100:897-903.
- Sluder, G., E.A. Thompson, F.J. Miller, J. Hayes, and C.L. Rieder.** 1997. The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry. *J Cell Sci*. 110:421-9.
- Small, J.V.** 1989. Microfilament-based motility in non-muscle cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1:75-9.
- Smits, V.A., R. Klompaker, L. Arnaud, G. Rijksen, E.A. Nigg, and R.H. Medema.** 2000. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol*. 2:672-6.
- Snyder, J.A., and J.R. McIntosh.** 1975. Initiation and growth of microtubules from mitotic centers in lysed mammalian cells. *J Cell Biol*. 67:744-60.
- Solnica-Krezel, L., M. Diggins-Gilicinski, T.G. Burland, and W.F. Dove.** 1990. Variable pathways for developmental changes in composition and organization of microtubules in *Physarum polycephalum*. *J Cell Sci*. 96:383-93.
- Soltys, B.J., and G.G. Borisy.** 1985. Polymerization of tubulin in vivo: direct evidence for assembly onto microtubule ends and from centrosomes. *J Cell Biol*. 100:1682-9.



- Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G.S. Bloom, and M.C. Mumby.** 1995. A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. *J Cell Biol.* 128:1131-44.
- Spellman, P.T., G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein, and B. Futcher.** 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* 9:3273-3297.
- Spiegelman, B.M., M.A. Lopata, and M.W. Kirschner.** 1979. Multiple sites for the initiation of microtubule assembly in mammalian cells. *Cell.* 16:239-52.
- Spooner, B.S., K.M. Yamada, and N.K. Wessells.** 1971. Microfilaments and cell locomotion. *J Cell Biol.* 49:595-613.
- Stearns, T., L. Evans, and M. Kirschner.** 1991. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell.* 65:825-36.
- Steffen, W., E.A. Fajer, and R.W. Linck.** 1994. Centrosomal components immunologically related to tektins from ciliary and flagellar microtubules. *J Cell Sci.* 107:2095-105.
- Steffen, W., and R.W. Linck.** 1988. Evidence for tektins in centrioles and axonemal microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:2643-7.
- Stephens, R.E.** 1995. Preparation of ciliary and flagellar remnants. *Methods Cell Biol.* 47:361-4.
- Stern, B.M., and A.W. Murray.** 2001. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol.* 11:1462-7.
- Stevenson, V.A., J. Kramer, J. Kuhn, and W.E. Theurkauf.** 2001. Centrosomes and the Scrambled protein coordinate microtubule- independent actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 3:68-75.
- Stirling, D.A., K.A. Welch, and M.J. Stark.** 1994. Interaction with calmodulin is required for the function of Spc110p, an essential component of the yeast spindle pole body. *EMBO Journal.* 13:4329-42.
- Stockinger, L., and E. Cireli.** 1965. [An up-to-now unknown way of centriole propagation]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 68:733-40.
- Straight, A.F., and C.M. Field.** 2000. Microtubules, membranes and cytokinesis. *Curr Biol.* 10:R760-70.
- Strome, S., J. Powers, M. Dunn, K. Reese, C.J. Malone, J. White, G. Seydoux, and W. Saxton.** 2001. Spindle dynamics and the role of gamma-tubulin in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol Biol Cell.* 12:1751-64.
- Su, T.T., and S.J. Vidwans.** 2000. DNA defects target the centrosome. *Nat Cell Biol.* 2:E28-9.
- Summers, K., and M.W. Kirschner.** 1979. Characteristics of the polar assembly and disassembly of microtubules observed in vitro by darkfield light microscopy. *J Cell Biol.* 83:205-17.
- Surrey, T., F. Nedelec, S. Leibler, and E. Karsenti.** 2001. Physical properties determining self-organization of motors and microtubules. *Science.* 292:1167-71.
- Szollosi, A., H. Ris, D. Szollosi, and A. Debec.** 1986. A centriole-free *Drosophila* cell line. A high voltage EM study. *Eur J Cell Biol.* 40:100-4.
- Szollosi, D., P. Calarco, and R.P. Donahue.** 1972. Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J Cell Sci.* 11:521-41.
- Szollosi, D., and R.H. Hunter.** 1973. Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig: sperm penetration and pronucleus formation. *J Anat.* 116:181-206.
- Szollosi, D., and J.P. Ozil.** 1991. De novo formation of centrioles in parthenogenetically activated, diploidized rabbit embryos. *Biol Cell.* 72:61-6.

- Takahashi, M., H. Shibata, M. Shimakawa, M. Miyamoto, H. Mukai, and Y. Ono.** 1999. Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem.* 274:17267-74.
- Tamm, S.L.** 1982. Flagellated ectosymbiotic bacteria propel a eucaryotic cell. *J Cell Biol.* 94:697-709.
- Tanaka, E., T. Ho, and M.W. Kirschner.** 1995. The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol.* 128:139-55.
- Tassin, A.M., C. Celati, M. Moudjou, and M. Bornens.** 1998. Characterization of the human homologue of the yeast spc98p and its association with gamma-tubulin. *J Cell Biol.* 141:689-701.
- Tassin, A.M., C. Celati, M. Paintrand, and M. Bornens.** 1997. Identification of an Spc110p-related protein in vertebrates. *J Cell Sci.* 110:2533-45.
- Tassin, A.M., B. Maro, and M. Bornens.** 1985. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 100:35-46.
- Thompson, G.M., and L. Wolpert.** 1963. Isolation of motile cytoplasm from Amoeba proteus. *Exp. Cell REs.* 32:152-160.
- Tirnauer, J.S., and B.E. Bierer.** 2000. EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol.* 149:761-6.
- Tokuyama, Y., H.F. Horn, K. Kawamura, P. Tarapore, and K. Fukasawa.** 2001. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin- dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem.* 276:21529-37.
- Tournebize, R., A. Popov, K. Kinoshita, A.J. Ashford, S. Rybina, A. Pozniakovsky, T.U. Mayer, C.E. Walczak, E. Karsenti, and A.A. Hyman.** 2000. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in Xenopus egg extracts. *Nat Cell Biol.* 2:13-9.
- Tournier, F., M. Cyrklaff, E. Karsenti, and M. Bornens.** 1991. Centrosomes competent for parthenogenesis in Xenopus eggs support procentriole budding in cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:9929-33.
- Tournier, F., E. Karsenti, and M. Bornens.** 1989. Parthenogenesis in Xenopus eggs injected with centrosomes from synchronized human lymphoid cells. *Dev Biol.* 136:321-9.
- Tran, P.T., L. Marsh, V. Doye, S. Inoue, and F. Chang.** 2001. A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol.* 153:397-411.
- Tucker, J.B., M.M. Mogensen, C.C. Paton, J.B. Mackie, C.G. Henderson, and L.M. Leckie.** 1995. Formation of two microtubule-nucleating sites which perform differently during centrosomal reorganization in a mouse cochlear epithelial cell. *J Cell Sci.* 108:1333-45.
- Tucker, J.B., C.C. Paton, C.G. Henderson, and M.M. Mogensen.** 1993. Microtubule rearrangement and bending during assembly of large curved microtubule bundles in mouse cochlear epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 25:49-58.
- Tucker, J.B., C.C. Paton, G.P. Richardson, M.M. Mogensen, and I.J. Russell.** 1992. A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea. *J Cell Sci.* 102:215-26.
- Tucker, R.W., A.B. Pardee, and K. Fujiwara.** 1979. Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell.* 17:527-35.
- Tynan, S.H., A. Purohit, S.J. Doxsey, and R.B. Vallee.** 2000. Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. *J Biol Chem.* 275:32763-8.

- Ueda, M., R. Graf, H.K. MacWilliams, M. Schliwa, and U. Euteneuer.** 1997. Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9674-8.
- Umeda, M., and K. Emoto.** 1999. Membrane phospholipid dynamics during cytokinesis: regulation of actin filament assembly by redistribution of membrane surface phospholipid. *Chem Phys Lipids.* 101:81-91.
- Urbani, L., and T. Stearns.** 1999. The centrosome. *Curr Biol.* 9:R315-7.
- Uto, K., and N. Sagata.** 2000. Nek2B, a novel maternal form of Nek2 kinase, is essential for the assembly or maintenance of centrosomes in early *Xenopus* embryos. *Embo J.* 19:1816-26.
- Vaizel-Ohayon, D., and E.D. Schejter.** 1999. Mutations in centrosomin reveal requirements for centrosomal function during early *Drosophila* embryogenesis. *Curr Biol.* 9:889-98.
- van Oudenaarden, A., and J.A. Theriot.** 1999. Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nat Cell Biol.* 1:493-9.
- Vandre, D.D., F.M. Davis, P.N. Rao, and G.G. Borisy.** 1986. Distribution of cytoskeletal proteins sharing a conserved phosphorylated epitope. *Eur J Cell Biol.* 41:72-81.
- Vasquez, R.J., D.L. Gard, and L. Cassimeris.** 1999. Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton.* 43:310-21.
- Vaughn, K.C., and J.D. Harper.** 1998. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int Rev Cytol.* 181:75-149.
- Veomett, G., D.M. Prescott, J. Shay, and K.R. Porter.** 1974. Reconstruction of mammalian cells from nuclear and cytoplasmic components separated by treatment with cytochalasin B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:1999-2002.
- Verde, F., J. Mata, and P. Nurse.** 1995. Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *J Cell Biol.* 131:1529-38.
- Verkhovsky, A.B., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy.** 1999a. Network contraction model for cell translocation and retrograde flow. *Biochem Soc Symp.* 65:207-22.
- Verkhovsky, A.B., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy.** 1999b. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol.* 9:11-20.
- Vernos, I., J. Raats, T. Hirano, J. Heasman, E. Karsenti, and C. Wylie.** 1995. Xklp1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning. *Cell.* 81:117-27.
- Vidwans, S.J., and P.H. O'Farrell.** 1999. Cytoskeleton: centrosom-in absentia. *Curr Biol.* 9:R764-6.
- Vidwans, S.J., M.L. Wong, and P.H. O'Farrell.** 1999. Mitotic regulators govern progress through steps in the centrosome duplication cycle. *J Cell Biol.* 147:1371-8.
- Vogel, J.M., T. Stearns, C.L. Rieder, and R.E. Palazzo.** 1997. Centrosomes isolated from *Spisula solidissima* oocytes contain rings and an unusual stoichiometric ratio of alpha/beta tubulin. *J Cell Biol.* 137:193-202.
- Vorobjev, I., V. Malikov, and V. Rodionov.** 2001. Self-organization of a radial microtubule array by dynein-dependent nucleation of microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10160-5.
- Vorobjev, I.A., and S. Chentsov Yu.** 1982. Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *J Cell Biol.* 93:938-49.
- Vorobjev, I.A., V.I. Rodionov, I.V. Maly, and G.G. Borisy.** 1999. Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover. *J Cell Sci.* 112:2277-89.
- Vorobjev, I.A., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy.** 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J Cell Sci.* 110:2635-45.
- Wakefield, J.G., J.Y. Huang, and J.W. Raff.** 2000. Centrosomes have a role in regulating the destruction of cyclin B in early *Drosophila* embryos. *Curr Biol.* 10:1367-1370.

- Walczak, C.E.** 2000. Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 12:52-6.
- Walczak, C.E., T.J. Mitchison, and A. Desai.** 1996. XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell.* 84:37-47.
- Walworth, N.C.** 2000. Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 12:697-704.
- Wang, R.J., W. Wissinger, E.J. King, and G. Wang.** 1983. Studies on cell division in mammalian cells. VII. A temperature- sensitive cell line abnormal in centriole separation and chromosome movement. *J Cell Biol.* 96:301-6.
- Waterman-Storer, C.M., R.A. Worthylake, B.P. Liu, K. Burridge, and E.D. Salmon.** 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 1:45-50.
- Waters, J.C., R.W. Cole, and C.L. Rieder.** 1993. The force-producing mechanism for centrosome separation during spindle formation in vertebrates is intrinsic to each aster. *J Cell Biol.* 122:361-72.
- Waters, J.C., and E.D. Salmon.** 1997. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:37-43.
- Watt, F.M., and H. Harris.** 1980. Microtubule-organizing centres in mammalian cells in culture. *J Cell Sci.* 44:103-21.
- Weisenberg, R.C., and A.C. Rosenfeld.** 1975. In vitro polymerization of microtubules into asters and spindles in homogenates of surf clam eggs. *J Cell Biol.* 64:146-58.
- Wheatley, S.P., A. Carvalho, P. Vagnarelli, and W.C. Earnshaw.** 2001. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol.* 11:886-90.
- Wheeler, R.T., and L. Shapiro.** 1999. Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell.* 4:683-94.
- White, J., and S. Strome.** 1996. Cleavage plane specification in *C. elegans*: how to divide the spoils. *Cell.* 84:195-8.
- Whitehead, C.M., and J.B. Rattner.** 1998. Expanding the role of HsEg5 within the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle. *J Cell Sci.* 111:2551-61.
- Wiech, H., B.M. Geier, T. Paschke, A. Spang, K. Grein, J. Steinkotter, M. Melkonian, and E. Schiebel.** 1996. Characterization of green alga, yeast, and human centrins - Specific subdomain features determine functional diversity. *J Biol Chem.* 271:22453-22461.
- Wiese, C., A. Wilde, M.S. Moore, S.A. Adam, A. Merdes, and Y. Zheng.** 2001. Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science.* 291:653-6.
- Wiese, C., and Y. Zheng.** 2000. A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat Cell Biol.* 2:358-64.
- Wigge, P.A., O.N. Jensen, S. Holmes, S. Soues, M. Mann, and J.V. Kilmartin.** 1998. Analysis of the *Saccharomyces* spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *J Cell Biol.* 141:967-77.
- Wigley, W.C., R.P. Fabunmi, M.G. Lee, C.R. Marino, S. Muallem, G.N. DeMartino, and P.J. Thomas.** 1999. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol.* 145:481-90.
- Wilde, A., and Y. Zheng.** 1999. Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science.* 284:1359-62.
- Wilson, P.G., M.T. Fuller, and G.G. Borisy.** 1997. Monastral bipolar spindles: implications for dynamic centrosome organization. *J Cell Sci.* 110:451-64.

- Winey, M.** 1996. Keeping the centrosome cycle on track. Genome stability. *Curr Biol.* 6:962-4.
- Winey, M., L. Goetsch, P. Baum, and B. Byers.** 1991. MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J Cell Biol.* 114:745-54.
- Witczak, O., B.S. Skalhegg, G. Keryer, M. Bornens, K. Tasken, T. Jahnsen, and S. Orstavik.** 1999. Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *Embo J.* 18:1858-68.
- Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai.** 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol.* 3:E28-34.
- Wolfrum, U.** 1995. Centrin in phosphoreceptor cells of mammalian retinae. *Cell Motil. Cytoskel.* 32:55-64.
- Woolley, D.M., and D.W. Fawcett.** 1973. The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *Anat Rec.* 177:289-301.
- Wright, B.D., M. Terasaki, and J.M. Scholey.** 1993. Roles of kinesin and kinesin-like proteins in sea urchin embryonic cell division: evaluation using antibody microinjection. *J Cell Biol.* 123:681-9.
- Wright, M., and A. Moisan.** 1982. *Protoplasma.* 113:69.
- Wright, R.L., B. Chojnacki, and J.W. Jarvik.** 1983. Abnormal basal-body number, location, and orientation in a striated fiber-defective mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol.* 96:1697-707.
- Wright, R.L., J. Salisbury, and J.W. Jarvik.** 1985. A nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation. *J Cell Biol.* 101:1903-12.
- Wynshaw-Boris, A., and M.J. Gambello.** 2001. LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev.* 15:639-51.
- Xu, X., Z. Weaver, S.P. Linke, C. Li, J. Gotay, X.W. Wang, C.C. Harris, T. Ried, and C.X. Deng.** 1999. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell.* 3:389-95.
- Yeh, E., C. Yang, E. Chin, P. Maddox, E.D. Salmon, D.J. Lew, and K. Bloom.** 2000. Dynamic positioning of mitotic spindles in yeast: role of microtubule motors and cortical determinants. *Mol Biol Cell.* 11:3949-61.
- Young, A., J.B. Dichtenberg, A. Purohit, R. Tuft, and S.J. Doxsey.** 2000. Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol Biol Cell.* 11:2047-56.
- Yvon, A.M., and P. Wadsworth.** 1997. Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells. *J Cell Sci.* 110:2391-401.
- Zatsepina, O.V., A. Rousselet, P.K. Chan, M.O. Olson, E.G. Jordan, and M. Bornens.** 1999. The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J Cell Sci.* 112:455-66.
- Zhang, L., T.J. Keating, A. Wilde, G.G. Borisy, and Y. Zheng.** 2000. The role of Xgrip210 in gamma-tubulin ring complex assembly and centrosome recruitment. *J Cell Biol.* 151:1525-36.
- Zheng, Y., M.L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison.** 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378:578-83.
- Zickler.** 1970. Division and Centrosomal laques during Mitosis and Meiosis in Some Ascomycetes. *Chromosoma.* 30:287-304.
- Zigmond, S.H.** 1996. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol.* 8:66-73.

- Zimmerman, W., and S.J. Doxsey.** 2000. Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles. *Traffic*. 1:927-34.
- Zorn, G.A., J.J. Lucas, and J.R. Kates.** 1979. Purification and characterization of regenerating mouse L929 karyoplasts. *Cell*. 18:659-72.

## **Thèses**

**Bobinnec, Y.** (1997). Le centrosome des cellules animales: le rôle des centrioles. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris VI

**Caudron, N.** (2001). Instabilité chimique dans les solutions microtubulaires : étude et recherche d'effecteurs. Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier-Grenoble I

**Camalet, S.** (2001). Oscillations critiques de systèmes biologiques. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris VI

**Kuntziger, T.** (2001). Sur quelques aspects de la dynamique des microtubules et de la duplication du centrosome dans l'ovocyte de xénope. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris VI

**Middendorp, S.** (1998). Caractérisation et analyse fonctionnelle des centrines humaines. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris VI

**Paoletti, A.** (1996) Etude du cycle de duplication du centrosome dans les cellules animales. Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud, UFR scientifique d'Orsay.

**Parmeggiani, A.** (2000). Rendement énergétique et stochasticité des moteurs moléculaires. Thèse de doctorat de l'Université Paris VII