



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue le 16/12/2015 par :

Hadrien Mary

**Analyse et Modélisation de la Dynamique des Chromosomes durant
la Mitose chez la Levure à Fission**

JURY

KERSTIN BYSTRICKY
ANDREA PARMEGGIANI
BENOIT ARCANGIOLI
FRANÇOIS MOLINO
YANNICK GACHET
SYLVIE TOURNIER
GUILLAUME GAY

Professeur d'Université
Directeur de Recherche
Professeur d'Université
Maître de Conférences
Directeur de Recherche
Directeur de Recherche
Chercheur Indépendant

Président du Jury
Membre du Jury
Membre du Jury
Membre du Jury
Membre du Jury
Membre du Jury Invité
Membre du Jury Invité

École doctorale et spécialité :

École Doctorale Biologie Santé Biotechnologies

Unité de Recherche :

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération (UMR 5088)

Directeur(s) de Thèse :

Sylvie Tournier et Yannick Gachet

Rapporteurs :

Andrea Parmeggiani, Benoit Arcangioli et François Molino

« *The dream of every cell is to become two cells.* »
François Jacob, 1974

Résumé

La mitose est une étape clé du cycle cellulaire, très préservée chez toutes les cellules eucaryotes, durant laquelle le matériel génétique de la cellule (les chromosomes) est séparé en deux puis réparti de manière égale dans les deux cellules filles. Cette équipartition du matériel génétique est cruciale pour le maintien de la stabilité génétique. Durant ce processus, la cellule forme une plaque métaphasique au centre du fuseau mitotique composé des chromatides sœurs. Chaque chromatide est alors attachée à son pôle respectif (on parle d'attachement bipolaire) vers lequel elle se dirigera durant l'anaphase.

Les chromatides sont l'unité indivisible du matériel génétique durant la mitose, à l'image des atomes dans une molécule. Initialement chacun de ces « objets » est libre (non attaché) et positionné de manière non ordonné dans le noyau. Toute la complexité de la mitose est d'attacher chacune des chromatides au bon pôle afin d'exercer des forces sur ces derniers pour les positionner sur la plaque métaphasique au centre du fuseau avant leur séparation et migration vers les pôles durant l'anaphase.

Cette étape de la division cellulaire requiert donc non seulement un complexe réseau d'interaction et de signalisation métabolique comme dans beaucoup d'autres processus biologiques mais aussi un fin contrôle spatio-temporel du mouvement et du positionnement de ces objets de grande taille à l'échelle de la cellule: les chromatides.

Il est à ce jour clairement établi qu'une grande partie de l'énergie nécessaire au mouvement des chromatides durant la mitose provient de la dépolymérisation de l'extrémité + des microtubules (MTs) qui attache chaque chromatide par l'intermédiaire d'un grand complexe protéique appelé le kinétochore. Bien que le mécanisme de transfert d'énergie entre la dépolymérisation des MTs et le mouvement des chromatides reste encore très largement hypothétique.

La dynamique des chromosomes durant la mitose est par ailleurs largement contrôlée par un grand nombre d'acteurs autres que les microtubules. Certains d'entre eux étant responsables de l'attachement MTs-kinétochore comme les complexes NDC80 et DAM1, tandis que d'autres sont impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules comme la kinésine-8 et la kinésine-13 ainsi que différentes protéines associées aux microtubules (MAPs) tel que XMAP215 ou encore EB1. De plus il existe des preuves que les chromatides peuvent être transportées le long du fuseau à l'aide de kinésine comme Cenp-E mais aussi de la dynéine. *[TODO reprendre]*

Durant mon travail de thèse j'ai étudié la dynamique des chromosomes en mitose chez la levure à fission qui à l'avantage de conserver les mécanismes primordiaux de la mitose avec les eucaryotes supérieurs. Deux mécanismes que l'on retrouve chez de nombreuses cellules sont l'alignement des chromosomes durant la métaphase ainsi qu'un mouvement de va et vient plus ou moins régulier le long du fuseau aussi appelé oscillations des chromosomes. J'ai montré en analysant les trajectoires des chromosomes que ces deux processus sont pour une large part indépendants chez la levure à fission (article en cours de révision). De plus le processus d'alignement des chromosomes, encore mal compris, est en parti contrôlé par la kinésine-8 via une activité dépendante de la longueur des microtubules. Il semblerait donc qu'une protéine, la kinésine-8, soit capable de fournir une information spatiale le long du fuseau mitotique afin de positionner correctement les chromosomes. Enfin j'ai utilisé un modèle mathématique du fuseau mitotique développé dans l'équipe afin de tester de manière quantitative les hypothèses de mécanisme du centrage des chromosomes par la kinésine-8.

L'ensemble de mon travail s'est donc intéressé au contrôle du mouvement, de l'attachement et du positionnement des chromosomes durant la mitose afin de mieux comprendre la biophysique du fuseau mitotique.

Summary

Mitosis is a critical step during cell cycle, well conserved in all eukaryotic cells, during

Mitosis is a highly preserved process in all eukaryotic cells during which genetic material (chromosomes) is divided in two parts and then spread in both daughter cells. This equipartition is crucial for maintaining genetic stability. During this process

(TODO: A FINIR)

Remerciements

...

Table des matières

Résumé	i
Summary	iii
Remerciements	v
1 Introduction	1
1.1 La vie d'une cellule	3
1.2 La mitose : une étape du cycle cellulaire	5
1.2.1 Les phases de la mitose	5
1.2.2 Les erreurs en mitose : causes et conséquences	7
1.3 L'appareil mitotique : un objet sous contrainte	7
1.4 La métaphase : point d'orgue de la division cellulaire	7
1.5 La dynamique des chromosomes durant la métaphase	7
1.6 Modélisation mathématique du mouvement des chromosomes en mitose	7
1.7 La levure à fission : un organisme modèle pour l'étude du cycle cel- lulaire	7
1.8 Problématique	7
2 Résultats	9
2.1 « Kinetochore oscillations are not required for the role of Kinesin-8 in chromosome congression »	9

2.2	Modélisation bio-mécanique du fuseau mitotique	9
2.3	Analyse du mouvement des chromosomes par la MSD via une ap- proche bayésienne	9
3	Discussion	11
3.1	Le mouvement de chromosomes durant la mitose	11
3.2	Le mécanisme d'alignement des chromosomes: de <i>l'in silico</i> à <i>l'in vivo</i>	11
A	Annexes	13
A.1	Annexe 1 : bla bla bla bla	13
	Bibliographie	15

Liste des figures

1.1	Illustration du livre «Cell theory» de Rudolf Virchow (Virchow, 1860)	2
1.2	Les différentes étapes du cycle cellulaire	4
1.3	Les différentes étapes de la mitose (adapté de Cheeseman and Desai (2008))	6

Liste des tableaux

1

Introduction

La cellule est un objet complexe que l'Homme, depuis longtemps maintenant, essaie de comprendre. En effet c'est en 1665 que Robert Hooke, un savant anglais, observa pour la première fois au microscope des «petites unités structurales» qu'il décrira plus tard dans un ouvrage intitulé «Micrographia» (Hooke (2003)). Sans vraiment réaliser la portée de son observation, il venait de décrouvrir la cellule.

Plus tard, au début du 19ème siècle, la théorie cellulaire apparaît; stipulant que tous les organismes sont formés de cellules. La cellule devient alors la plus petite unité indivisible qui compose le vivant.

Au milieu du 19ème siècle, un médecin allemand nommé Rudolf Virchow va alors révolutionner la théorie cellulaire (Figure 1.1) en démontrant qu'une cellule provient nécessairement qu'une autre cellule (Virchow (1860)). Il écrivait alors «*Omnis cellula e cellula*» qui signifie «Toutes les cellules sont issues d'autres cellules.» Ses travaux seront ensuite confirmés par un scientifique français du nom de Louis Pasteur qui malgré de nombreuses controverses parvint à faire tomber le mythe de la génération spontanée.

C'est véritablement au 20ème siècle que toute la complexité de la cellule se dévoile grâce à l'apparition de nombreuses avancées technologiques tel que la découverte de l'ADN, l'apparition de la biologie moléculaire ainsi que la création de microscope toujours plus précis.

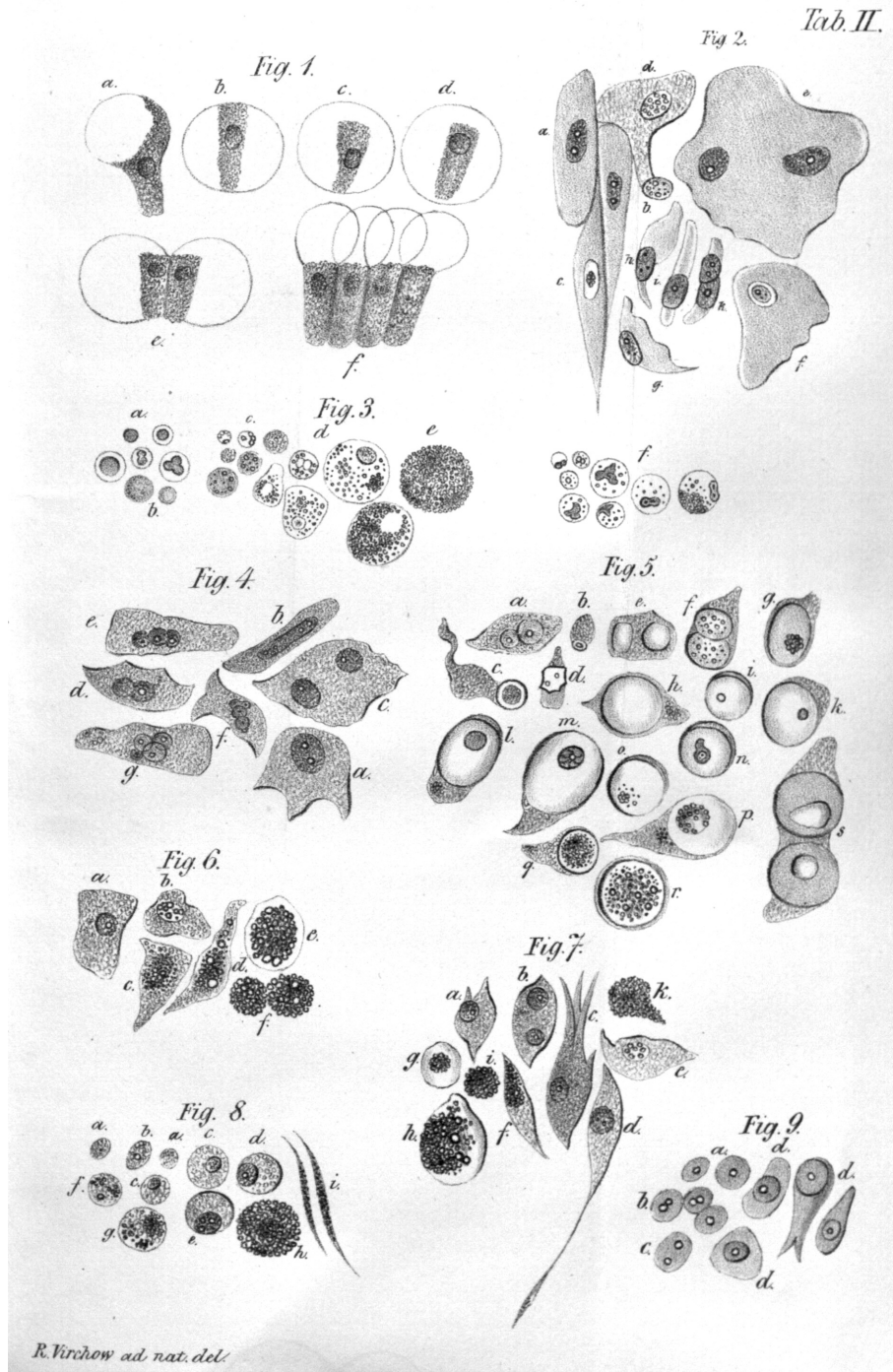


Figure 1.1: Illustration du livre «Cell theory» de Rudolf Virchow (Virchow, 1860)

Ce travail de thèse a pour objectif l'étude d'une phase tout à fait cruciale durant la vie d'une cellule: le moment où elle se divise. Cette étape, aussi appelé la mitose, permet selon le second axiome de la théorie cellulaire, le maintien de l'intégrité cellulaire tout au long des générations.

Enfin il est aussi bon de souligner que l'étude de la mitose est un domaine d'étude important pour deux raisons majeures. Mieux comprendre le fonctionnement du vivant par la compréhension de ce mécanisme primordial sans lequel la vie ne serait jamais apparu sur Terre. Ainsi que son rôle fondamentale dans l'étude du cancer; qui n'est autre qu'un ensemble de maladie impliquant un dérèglement de la division cellulaire. (TODO: A REFORMULER???)

1.1 La vie d'une cellule

Le cycle cellulaire correspond à l'ensemble des étapes qui composent la vie d'une cellule. Cette série d'évènement varie de manière considérable d'une cellule à une autre. Le cycle cellulaire dépend de l'identité de la cellule (principalement défini par son matériel génétique) ainsi que son contexte écologique; c'est à dire le milieu environnant dans lequel elle se trouve.

Malgré son incroyable diversité, certaines étapes du cycle cellulaire sont communes à l'ensemble des cellules. La vie d'une cellule est composé de deux étapes; une phase de croissance appelé l'interphase ainsi qu'une phase de division appelé la mitose.

C'est durant l'interphase que la cellule va passer la plupart de sa vie (Figure 1.2). Elle est composé de plusieurs étapes:

- une étape de croissance (**phase G1**) durant laquelle la cellule va augmenter sa taille ainsi que son volume cellulaire. C'est aussi durant cette période qu'elle va synthétiser un ensemble de protéine spécifique à son identité propre ainsi qu'au milieu dans lequel elle se trouve.
- une étape de synthèse (**phase S**) durant laquelle la cellule va répliquer son matériel génétique, l'ADN. La duplication des chromosomes est une étape crucial pour le maintien de la stabilité génétique. En effet chacun des nucléotides (allant de quelques milliers à plusieurs milliard selon le type de cellule) doit être dupliqués avec une grande précision afin que les deux cellules filles se voit transmettre la même information génétique.

- une étape de préparation de la division cellulaire (**phase G2**) durant laquelle la cellule relance la synthèse de protéine et croît rapidement afin de préparer sa division. Cette phase est importante car elle possède un système de blocage du cycle cellulaire (aussi appelé «checkpoint» ou «point de contrôle») qui permet de retarder l'entrée en mitose en cas de problème de réplication de l'ADN apparu en phase S.

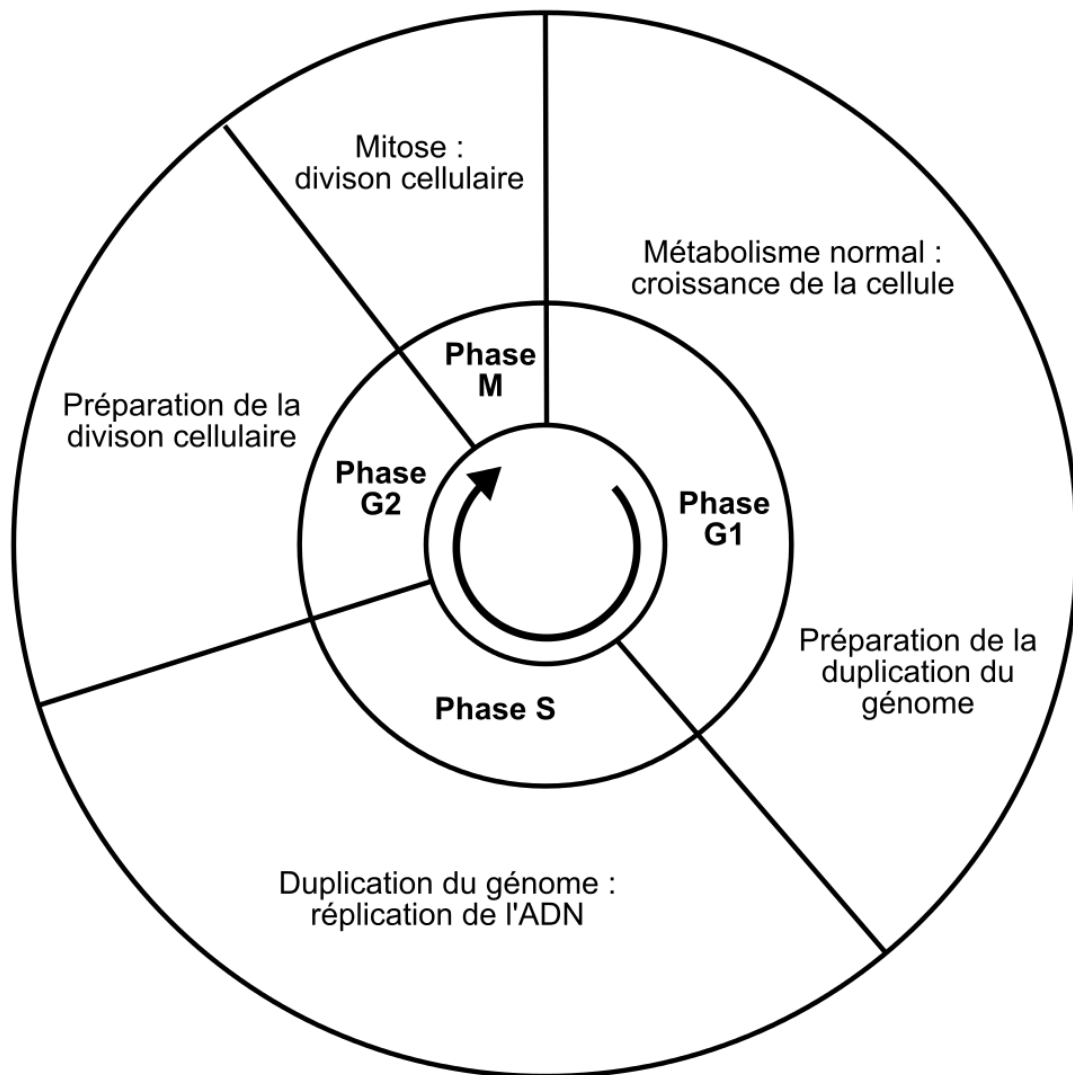


Figure 1.2: Les différentes étapes du cycle cellulaire

Enfin la mitose qui fait suite à l'interphase (Figure 1.2) est l'étape durant laquelle la cellule se divise en deux cellules filles.

Il est important d'insister sur le fait que dans la réalité, il existe autant de cycle cellulaire différent qu'il existe de type de cellule. Il est donc important de noter que

malgré la conservation de certains mécanismes primordiaux, chaque type de cellule possède son propre cycle cellulaire.

On soulignera aussi que l'un des enjeux de la biologie cellulaire aujourd'hui est de comprendre quelle part de ces mécanismes sont conservés entre différents type cellulaire et quelle part sont spécifiques. (TODO A REFORMULER???)

1.2 La mitose : une étape du cycle cellulaire

La dernière étape du cycle cellulaire est la mitose. Durant cette étape la cellule mère va se diviser en deux cellules filles. Tout les mécanismes précédent et ceux composant la mitose ont pour objectif d'assurer une division intègre et égale entre les deux cellules filles.

1.2.1 Les phases de la mitose

De manière étonnante, la mitose est un processus relativement bien conservé chez la majorité des cellules eucaryotes. Les grandes phases la composant peuvent donc être décrites de manière commune pour un grand nombre d'organismes.

Les différentes phases de la mitose sont (Figure 1.3) :

- **prophase** : les brins d'ADN (la chromatine) se condensent pour former des structures ordonnées et séparées les unes des autres; les chromosomes. Les deux pôles (appelé centrosome chez les eucaryotes supérieurs) se séparent et commencent à migrer vers leurs extrémités respectives afin de former le fuseau mitotique.
- **prométaphase** : la membrane nucléaire se désassemble dans le cas d'une mitose ouverte tandis qu'elle reste intact dans les mitoses fermées (répandu chez les protistes et organismes unicellulaires). Les chromosomes s'attachent aux microtubules par l'intermédiaire d'une structure protéique qui s'assemble au même moment au niveau du centromère des chromosomes: le kinétochore.
- **métaphase** : les chromosomes alors attachés aux pôles par l'intermédiaire des microtubules viennent alors se positionner à l'équateur de la cellule pour former la plaque métaphasique. Cette étape cruciale de la mitose possède des mécanismes de détections des chromosomes mal attachés afin de retarder le passage à l'étape suivante si besoin.

- **anaphase** : durant l'anaphase A, les chromosomes sont «tirés» vers leurs pôles respectifs par la dépolymérisation des microtubules qui les attachent tandis que durant l'anaphase B, le fuseau mitotique s'allonge, éloignant alors les pôles et les chromosomes loin du centre de la cellule. On notera que ces deux phases peuvent être distinctes ou pas selon le type de cellule étudié.
- **télophase** : les microtubules attachant les kinétochores se désagrègent, les chromosomes se décondensent retournant à leurs états initiaux de brins d'ADN. L'enveloppe nucléaire se reforme dans le cas d'une mitose ouverte.
- **cytokinèse** : à ce stade la mitose est fini. Durant cette période, la cellule se divise grâce à la formation d'un sillon au niveau de la membrane cytoplasmique qui va alors s'invaginer jusqu'à «couper» la cellule mère en deux cellules filles.

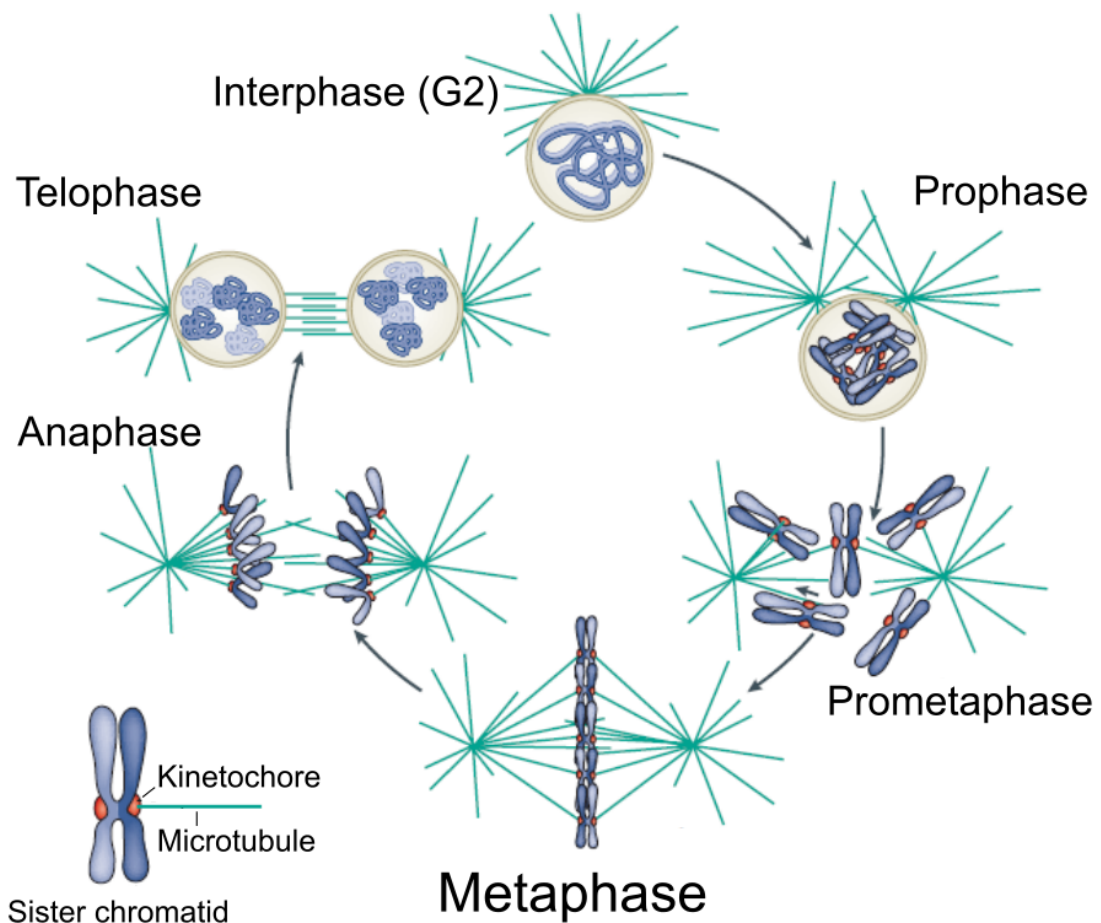


Figure 1.3: Les différentes étapes de la mitose (adapté de Cheeseman and Desai (2008))

1.2.2 Les erreurs en mitose : causes et conséquences

1.3 L'appareil mitotique : un objet sous contrainte

1.4 La métaphase : point d'orgue de la division cellulaire

1.5 La dynamique des chromosomes durant la métaphase

1.6 Modélisation mathématique du mouvement des chromosomes en mitose

1.7 La levure à fission : un organisme modèle pour l'étude du cycle cellulaire

1.8 Problématique

2

Résultats

2.1 « Kinetochore oscillations are not required for the role of Kinesin-8 in chromosome congression »

2.2 Modélisation bio-mécanique du fuseau mitotique

- parler modèle d'attachement à deux états et des avantages d'un modèle à trois états

2.3 Analyse du mouvement des chromosomes par la MSD via une approche bayésienne

- bla bla bla

3

Discussion

- 3.1 Le mouvement de chromosomes durant la mitose
- 3.2 Le mécanisme d'alignement des chromosomes: de
l'in silico à *l'in vivo*



Annexes

A.1 Annexe 1 : bla bla bla bla

Bibliographie

Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 33–46.

Hooke, R. (2003). *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses, with Observations and Inquiries There-upon* (Dover Publications).

Virchow, R.L.K. (1860). *Cellular pathology* (John Churchill).