

Université
de Toulouse

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 | Professeur d'Université | Président du Jury |
| BENOIT ARCANGIOLI | Professeur d'Université | Membre du Jury |
| EMMANUELLE FABRE | Directrice de Recherche | Membre du Jury |
| ANDREA PARMEGGIANI | Directeur de Recherche | Membre du Jury |
| YANNICK GACHET | Directeur de Recherche | Membre du Jury |
| SYLVIE TOURNIER | Directeur de Recherche | Membre du Jury Invité |
| GUILLAUME GAY | Chercheur Indépendant | 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 :

Benoit Arcangioli et Emmanuelle Fabre

« Le rêve de chaque cellule est de devenir deux cellules. »

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) réparti de manière égale dans les deux cellules filles. Cette équpartition du matériel génétique est cruciale pour le maintien de la stabilité génétique. Durant ce processus, les chromosomes, composés des chromatides sœurs, établissent une plaque métaphasique au centre du fuseau mitotique. Chaque chromatide est attachée à un pôle du fuseau mitotique 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, une fois la chromatine condensée en chromosomes, chacun de ces « objets » est détaché et réparti suivant une position précise appellée territoires chromosomiques. Toute la complexité de la mitose est de capturer chacune des chromatides et de les positionner sur la plaque métaphasique avant leur séparation et migration vers leur pôle respectif durant l'anaphase.

Cette étape de la division cellulaire requiert donc non seulement un réseau complexe d'interaction et de signalisation biochimique 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.

Il semblerait que l'origine du mouvement des chromosomes provienne pour une grande part de la dynamique des microtubules. Ce qui est moins certain est la part relative accordée aux différents processus régulant cette dynamique; que ce soit la dynamique intrinsèque (appelée instabilité dynamique des microtubules) ou l'effet de différentes protéines sur les microtubules comme les MAPs (Microtubule Associated Proteins) et les kinésines (protéines motrices). On notera par ailleurs que le mécanisme de transfert d'énergie entre la dynamique des microtubules et le mouvement des chromosomes est encore très largement hypothétique.

La dynamique des chromosomes durant la mitose est aussi 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.

Durant mon travail de thèse, j'ai étudié la dynamique des chromosomes en mitose chez

la levure à fission, modèle cellulaire dont les mécanismes primordiaux qui contrôlent la mitose sont conservés avec les eucaryotes supérieurs. En effet, j'ai caractérisé deux de ces mécanismes conservés au cours de l'évolution: 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 oscillation des chromosomes. J'ai montré, en analysant les trajectoires des chromosomes que ces deux processus sont pour une large part indépendants (Mary et al., 2015). De plus, le processus d'alignement des chromosomes, encore mal compris, est en partie contrôlé par la kinésine-8 via une activité dépendante de la longueur des microtubules. Il semblerait donc que cette kinésine 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 de la ségrégation des chromosomes précédemment 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 porte donc sur le contrôle du mouvement, de l'attachement et du positionnement des chromosomes durant la mitose afin de mieux comprendre les processus biophysiques associés à la mitose.

Summary

Mitosis is a highly preserved process in all eukaryotic cells during which the genetic material (chromosomes) is divided in two parts which spread in both daughter cells. This equipartition is crucial for maintaining genetic stability. During this process, chromosomes form a metaphasic plate at the center of the mitotic spindle. Each chromatid is attached to its respective spindle pole (called bipolar attachment) toward which it will move during anaphase.

Chromatids are the indivisible units of genetic material during mitosis just like atoms in a molecule. Originally each of these « objects » are detached and organized in chromosomes territories. All the complexity of mitosis resides in the capture of each chromatid by the spindle pole to exert forces to position them on the metaphase plate before their separation and migration towards their respective poles in anaphase.

This step of cell division not only requires complex interaction networks and metabolic signaling pathways just like many other biological processes but also a fine spatio-temporal control of movement and positioning of these big objects relative to cell size.

It is usually accepted that the origin of chromosome movement arises from microtubule dynamics. However, what is less clear is the relative importance of each of these processes regulating chromosome movement: the intrinsic dynamic instability of microtubules or the effect of their associated proteins such as MAPs and kinesins. It is also important to note that the mechanism controlling the transfer of energy between microtubule dynamics and chromosome movement is still largely hypothetical.

Moreover, chromosome dynamics during mitosis is regulated by a large number of actors apart from microtubules. Some of them being responsible for MT-kinetochore attachment such as NDC80 and DAM1 complex. While others are involved in the regulation of MT dynamics such as Kinesin-8 and Kinesin-13.

During my PhD, I studied fission yeast chromosome dynamic during mitosis. This cellular model has the advantage of sharing many fundamental mechanisms of symmetrically dividing higher eukaryotic cells. I characterized two of these conserved mechanisms: chromosome alignment during metaphase and back and forth movement along the spindle, called chromosome oscillation. By analyzing chromosome trajectories, I showed that both processes are performed through independent mechanisms (Mary et al., 2015). Moreover,

chromosome alignment process, which is still poorly understood, is regulated by Kinesin-8 via a length dependent activity on microtubules. This suggests that Kinesin-8 is able to provide spatial information along the mitotic spindle to properly position chromosomes. Finally, I used a mathematical model of chromosome segregation in order to test quantitatively different hypotheses of chromosome centering process.

This work is thus deciphering the control of movement, attachment and positioning of chromosomes during mitosis and seeks to better understand the biophysical processes controlling mitosis.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury : Emmanuelle Fabre, Benoit Arcangioli, Andrea Parmeggiani ainsi que Kerstin Bystricky. Merci d'avoir pris le temps de vous intéresser à mon travail de thèse et d'avoir accepté de l'évaluer.

Je remercie Sylvie et Yannick d'avoir cru en moi pour m'accepter en thèse il y a maintenant un peu plus de trois ans, alors même qu'ils cherchaient un ingénieur ! Merci de m'avoir initié au vaste monde de la recherche notamment à travers votre expérience et votre patience.

Un grand merci à toi Guillaume pour m'avoir transmis tes connaissances toujours avec plaisir, passion et ton infatigable patience. Merci à toi Jonathan pour ta vision des choses et de t'être plongé dans ce sujet à mes côtés avec tant de curiosité. Enfin un grand merci à vous deux pour vos qualités humaines.

Une mention spéciale à Céline ainsi que tout les membres présents et passés de l'équipe. Céline et Tiphaine, merci pour votre dédicace à m'avoir enseigné toutes les astuces relatives à l'étude de la levure, mais aussi et surtout votre bonne humeur autour de la paillasse du labo. Simon et Tong, je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Je remercie aussi Andreas Merdes ainsi que Florence Larminat pour avoir suivi mon travail de thèse pendant deux ans. Nos discussions et vos commentaires ont toujours été d'une aide précieuse.

Un énorme merci à tout le labo du LBCMCP ! Gardez cette ambiance qui constitue votre ADN et fait de vous ce petit labo aux allures de grand dans lequel il fait bon travailler. Merci à Pierre, Jonathan, François, Julie, Anne, Carole, Béa, Damien, Gaëlle, Nathalie, Magalie, Thomas, Yvan, Aude, Gemaël, Kader, mais aussi à tous ceux que je ne cite pas.

Je veux aussi remercier Maman et Jacques pour votre soutien, votre patience infinie durant toutes ces années mais aussi votre sens innée des grandes réunions familiales réussies. Merci à Papa pour nos nombreux voyages aux quatre coins de la France ou ailleurs, nos longues discussions parisiennes interminables et ton soutien sans faille depuis toujours. Un grand merci à mes frères : Julien, encore quelques années avant d'en voir le bout à ton tour, Aurélien, j'espère que trouveras une voie dans laquelle tu pourras t'épanouir.

Un énorme merci à toute ma famille. Celle que je vois régulièrement et celle que je vois rarement, celle qui est proche autant que celle qui est loin.

Un grand merci à Anne, Pauline, Charlotte et Julien pour ces délicieux moments passés ensemble à Toulouse et ailleurs.

Un grand merci à Pascaline et Alain pour m'avoir accueilli depuis quelques années maintenant dans votre famille avec tant de bonne humeur. Je remercie aussi Théo, Bastien et Lucas pour ces moments passés ensemble.

Je veux aussi remercier tous mes amis, ceux que je connais depuis longtemps et ceux que j'ai connu plus récemment. Un merci particulier à tous ceux que je vois peu mais qui sont toujours présent quand l'heure des retrouvailles sonne !

Mes derniers remerciements vont à Olivia qui a tout fait pour m'aider, qui m'a soutenu et surtout supporté depuis ces trois ans. Une nouvelle page s'ouvre à nous maintenant...

Table des matières

| | |
|--|------------|
| Table des matières | iii |
| Liste des figures | vii |
| Liste des acronymes | xi |
| 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 Le kinétochore | 8 |
| 1.2.3 Les microtubules | 9 |
| 1.2.4 Les kinésines dépolymérisatrices des microtubules | 11 |
| 1.2.5 L'ancrage du microtubule au kinétochore | 13 |
| 1.2.6 Les différents types d'attachements | 15 |
| 1.3 La métaphase : point d'orgue de la division cellulaire | 18 |
| 1.3.1 La congression des chromosomes | 18 |
| 1.3.2 Le mouvement des chromosomes | 20 |
| 1.3.3 Le fuseau mitotique : un objet sous contrainte | 23 |
| 1.3.4 Le point de contrôle de la transition métaphase/anaphase | 24 |
| 1.4 Modélisation mathématique de la mitose | 26 |
| 1.4.1 Que signifie « modéliser un processus biologique » ? | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.4.2 | Comment modéliser le mouvement des chromosomes ? | 28 |
| 1.4.2.1 | Types de forces en jeux | 28 |
| 1.4.2.2 | L'équation du mouvement | 30 |
| 1.4.2.3 | Application au fuseau mitotique | 32 |
| 1.4.3 | L'assemblage du fuseau mitotique | 33 |
| 1.4.4 | La dynamique des chromosomes | 36 |
| 1.5 | La levure à fission : un organisme modèle pour l'étude du cycle cellulaire | 41 |
| 1.6 | Problématique | 44 |
| 2 | Résultats | 47 |
| 2.1 | « Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations » | 47 |
| 2.2 | Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase | 70 |
| 2.2.1 | La reconstruction de la trajectoire des trois chromosomes de la levure à fission : un challenge ? | 70 |
| 2.2.1.1 | Détection par fit gaussien | 71 |
| 2.2.1.2 | Reconstruction des trajectoires | 74 |
| 2.2.1.3 | Résumé du workflow de reconstruction des trajectoires . | 80 |
| 2.2.2 | L'état de cohérence du mouvement des kinétochores frères | 82 |
| 2.2.3 | Analyse du mouvement par « Mean Square Displacement » | 86 |
| 2.2.3.1 | La MSD, un outil pour accéder aux différents phénomènes gouvernant un mouvement | 86 |
| 2.2.3.2 | Mesure de la MSD appliquée au mouvement de Cen2-GFP | 88 |
| 2.3 | Modélisation bio-mécanique de la ségrégation des chromosomes | 94 |
| 2.3.1 | <code>kt_simul</code> : l'implémentation numérique du modèle de ségrégation des chromosomes | 94 |
| 2.3.2 | Un modèle de congression alternatif | 95 |
| 2.3.3 | Vers un modèle d'attachement à trois états | 100 |

| | |
|--|------------|
| 3 Discussion | 105 |
| 3.1 L'approche multidisciplinaire comme méthode d'étude en biologie cellulaire | 105 |
| 3.2 La dynamique des chromosomes en mitose | 107 |
| 3.2.1 Le mécanisme de congression des chromosomes | 107 |
| 3.2.2 La régulation du mouvement des chromosomes | 109 |
| 3.2.3 Vers un modèle global de la division cellulaire | 114 |
| A Annexes | 117 |
| A.1 Exemple d'utilisation de <code>kt_simul</code> | 117 |
| A.2 Le complexe DAM1 favorise l'attachement microtubule-kinétochore | 121 |
| A.3 Paramètres minimums reproduisant un mouvement oscillatoire | 123 |
| A.3.1 Un modèle naïf du mouvement d'un chromosome | 123 |
| A.3.2 Étude des trajectoires avec des techniques d'analyse du signal . . | 126 |
| A.3.3 Optimisation des paramètres | 128 |
| Bibliographie | 131 |

Ce document est mis à disposition selon les termes de la licence Creative Commons “Attribution - Partage dans les mêmes conditions 4.0 International” .



Le source code utilisé pour générer cette thèse est librement disponible à https://github.com/hadim/phd_thesis (free as in freedom not as in a beer !).

Liste des figures

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Illustration du livre « Cell theory » de Rudolf Virchow | 2 |
| 1.2 | Les différentes étapes du cycle cellulaire | 4 |
| 1.3 | Les différentes étapes de la mitose | 7 |
| 1.4 | Structure d'un kinétochore | 9 |
| 1.5 | Structure et dynamique du microtubule | 10 |
| 1.6 | Reconstruction 3D des kinésines dépolymérisatrice | 12 |
| 1.7 | Les domaines protéiques des différentes kinésine-8 | 12 |
| 1.8 | Stucture de l'attachement kinétochore-microtubule | 13 |
| 1.9 | Structure du complexe DAM1 | 14 |
| 1.10 | Les différents types d'attachements des microtubules aux kinétochores . . | 16 |
| 1.11 | Le mécanisme de déstabilisation de l'attachement KT-MT | 17 |
| 1.12 | Deux types de cellules différentes en métaphase | 18 |
| 1.13 | Cellule humaine de la prophase à la métaphase | 19 |
| 1.14 | Modèle standard du changement de direction des kinétochores frères. . . | 22 |
| 1.15 | Schéma d'un fuseau mitotique en métaphase | 24 |
| 1.16 | Le mécanisme d'action du SAC | 25 |
| 1.17 | Workflow de l'approche modélisation en biologie | 27 |
| 1.18 | Schéma des trois éléments mécaniques fondamentaux | 30 |
| 1.19 | L'équation du mouvement | 31 |
| 1.20 | Modélisation mécanique du fuseau mitotique | 32 |
| 1.21 | Trajectoire des chromosomes <u>_in silico_</u> | 33 |

| | | |
|------|---|----|
| 1.22 | Modèle numérique de l'assemblage du fuseau | 34 |
| 1.23 | Temps moyen de capture des chromosomes | 34 |
| 1.24 | Deux mécanismes de l'assemblage du fuseau mitotique | 35 |
| 1.25 | Différents modèles de types d'attachement entre le microtubule et le kinétochore | 37 |
| 1.26 | Modèle de ségrégation des chromosomes | 39 |
| 1.27 | Morphologie de la levure à fission | 42 |
| 1.28 | Schéma du cycle cellulaire de la levure à fission | 43 |
| 1.29 | Visualisation d'un seul chromosome en microscopie à fluorescence | 44 |
| 2.1 | Image en microscopie à fluorescence de deux fuseaux mitotique | 71 |
| 2.2 | Distribution des intensités gaussiennes en deux dimensions | 72 |
| 2.3 | Précision de la détection des blobs | 73 |
| 2.4 | Principe de l'algorithme de détection de blob par déflation | 74 |
| 2.5 | Principe de l'algorithme de détection de blob par déflation | 75 |
| 2.6 | Le tracking est l'étape de liaison des objets d'intérêts dans le temps | 75 |
| 2.7 | Les deux matrices de coût du LAP tracker | 76 |
| 2.8 | Reconstruction de la trajectoire avec six kinétochères | 77 |
| 2.9 | Algorithme de tracking pour un chromosome | 79 |
| 2.10 | Reconstruction de la trajectoire du chromosome II et de ces deux pôles. | 79 |
| 2.11 | Interface graphique de correction manuelle des trajectoires | 81 |
| 2.12 | Workflow de reconstruction des trajectoires | 82 |
| 2.13 | Schéma de mouvement cohérent et incohérent des kinétochères frères. | 83 |
| 2.14 | Direction des kinétochères frères en metaphase. | 84 |
| 2.15 | Temps passé dans les différents états de cohérence dans différentes conditions | 84 |
| 2.16 | Distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions | 85 |
| 2.17 | Exemple de MSD pour trois types de diffusion théoriques | 88 |
| 2.18 | Exemple de MSD pour un mouvement dirigé et un mouvement brownien simulé | 89 |

| | | |
|------|--|-----|
| 2.19 | MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. | 90 |
| 2.20 | MSD en log-log pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions | 91 |
| 2.21 | Régression linéaire sur des MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions | 93 |
| 2.22 | Schéma décrivant le principe de la parallélisation en informatique | 95 |
| 2.23 | Premier mécanisme expliquant l'alignement des chromosomes | 96 |
| 2.24 | Distribution de l'alignement relatif des chromosomes en anaphase | 97 |
| 2.25 | Second mécanisme expliquant l'alignement des chromosomes | 99 |
| 2.26 | Modèle d'attachement à deux états | 100 |
| 2.27 | Modèle d'attachement à trois états | 102 |
| A.1 | Exemple de trajectoire générée par ‘kt_simul’ | 119 |
| A.2 | Animation graphique d'une simulation | 120 |
| A.3 | Trajectoire du chromosome II dans la levure à fission sans Dam1 | 121 |
| A.4 | Exemple de trajectoire générée par le modèle naïf du mouvement d'un chromosome | 125 |
| A.5 | Autocorrélation et transformée de Fourier d'un signal sinusoïdal bruité . | 127 |
| A.6 | Quelques exemples de trajectoires avec différents paramètres du modèle naïf du mouvement d'un chromosome | 129 |

Liste des acronymes

- **AP** : *anti-poleward*
- **GDP** : Guanosine diphosphate
- **GFP** : *Green Fluorescence Protein*
- **GTP** : Guanosine triphosphate
- **KT** : kinétochore
- **MAPs** : *microtubule associated proteins*
- **MT** : microtubule
- **P** : *poleward*
- **SAC** : *spindle assembly checkpoint*
- **SPB** : *spindle pole body*

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 structurelles » qu'il décrira plus tard dans un ouvrage intitulé « *Micrographia* » (Hooke, 2003). Sans vraiment réaliser la portée de son observation, il venait de découvrir 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 d'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 qui stipulait que la vie pouvait naître de la matière inerte (Pasteur, 1862).

C'est véritablement au 20ème siècle que toute la complexité de la cellule se dévoile à nous grâce à l'apparition de nombreuses avancées technologiques telle que la découverte de l'ADN (Watson et al., 1953), l'apparition de la biologie moléculaire ainsi que la création de microscopes toujours plus précis.

Ce travail de thèse a pour objectif l'étude d'une phase tout à fait cruciale durant la vie

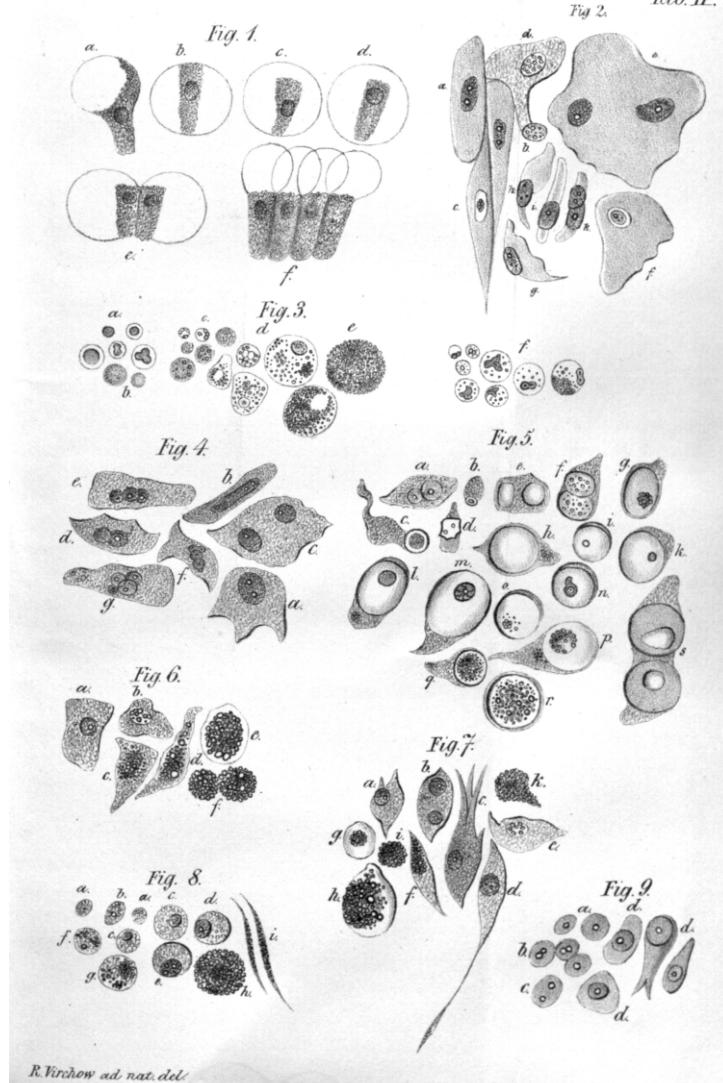


Figure 1.1: Illustration du livre « Cell theory » (Virchow, 1860) de Rudolf Virchow

d'une cellule: le moment où elle se divise. Cette étape, appelée la mitose, permet selon le second axiome de la théorie cellulaire, le maintien de l'intégrité cellulaire tout au long des générations.

La mitose est un domaine de recherche 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 apparue sur Terre.
- Mieux comprendre le cancer, qui n'est autre qu'un ensemble de maladies impliquant un dérèglement de la division cellulaire.

Mais avant de comprendre comment une cellule se divise, replaçons ce processus de division dans un contexte plus large qui consiste à déchiffrer les différentes étapes de la vie d'une cellule.

1.1 La vie d'une cellule

Comme le disait François Jacob en 1974, « *The dream of every cell is to become two cells.* ». Et quand elle n'essaie pas de devenir deux cellules, elle prépare tout afin que la division se déroule correctement. L'ensemble de ces processus qui dicte la vie d'une cellule est un cycle qui se répète depuis longtemps maintenant : le cycle cellulaire.

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

Malgré son incroyable diversité, on peut diviser le cycle cellulaire en deux grandes étapes communes à l'ensemble des organismes. Une étape de croissance appelée l'interphase ainsi qu'une étape de division appelée la mitose.

C'est durant l'interphase que la cellule va passer la plupart de son existence (Figure 1.2). Celle-ci est composée de plusieurs sous-étapes (Norbury and Nurse, 1992):

- une phase de croissance (**phase G1**) durant laquelle la cellule va augmenter en taille et accroître son volume cellulaire. C'est aussi durant cette période qu'elle va synthétiser l'ensemble des protéines spécifiques à son identité ainsi qu'en réponse au milieu dans lequel elle se trouve.

- une phase de synthèse (**phase S**) durant laquelle la cellule va répliquer son matériel génétique, l'ADN. La duplication des chromosomes est une étape cruciale pour le maintien de la stabilité génétique. En effet chacun des nucléotides (allant de quelques milliers à plusieurs milliards selon le type d'organisme) doit être dupliqué avec une grande précision afin que les deux cellules filles se voient transmettre la même information génétique.
- une phase 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 il existe à cette étape 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 ou encore d'éventuel dommage à l'ADN.
- la phase de division (**mitose ou phase M**) qui fait suite à l'interphase est l'étape durant laquelle la cellule se divise en deux cellules filles.

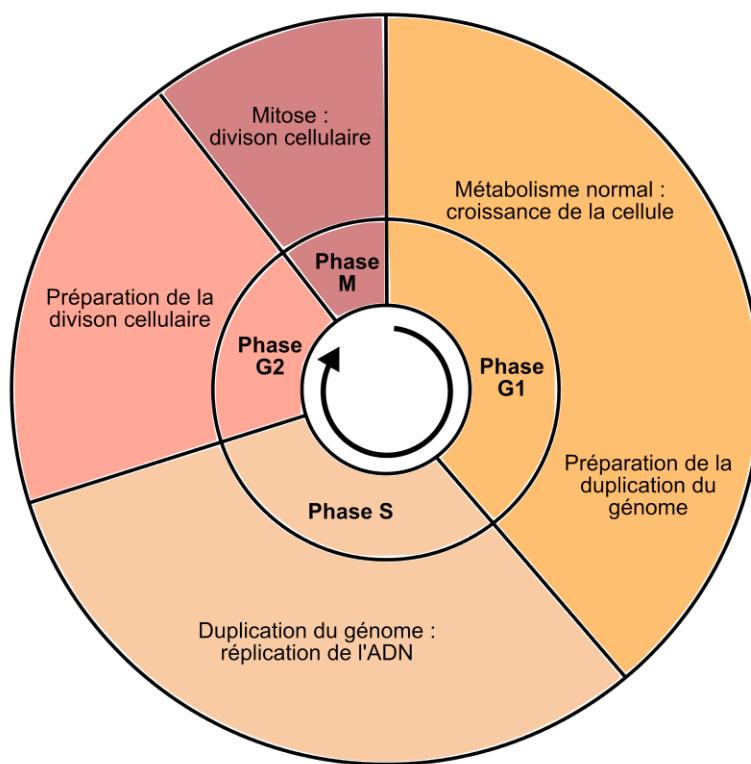


Figure 1.2: Les différentes étapes du cycle cellulaire. Les phases S et G2 préparent la division cellulaire qui a lieu à la phase M.

Il est important de souligner que dans la réalité, il existe autant de cycles cellulaires différents qu'il existe de type de cellules. Donc malgré la conservation de certains mécan-

ismes primordiaux, chaque type de cellules possède son propre cycle cellulaire (Lodish et al., 2000; Norbury and Nurse, 1992).

D'une manière plus générale on peut aussi noter que l'un des enjeux de la biologie cellulaire aujourd'hui est de comprendre quelle est la part des mécanismes conservés entre différents types cellulaires et quelle est la part spécifique de l'organisme étudié.

Une des phases crucial du cycle cellulaire est appelé la mitose, c'est le moment où une cellule va devenir deux cellules.

1.2 La mitose : une étape du cycle cellulaire

Durant l'étape de mitose, la cellule mère se divise en deux cellules filles. Tous les mécanismes précédents et ceux composant la mitose ont pour objectif d'assurer une division intègre et égale entre les deux cellules filles.

L'entrée en mitose est un événement contrôlé en grande partie par la kinase Cdc2 aussi appelée Cdk1 (Nasmyth and Reed, 1980; Nurse and Thuriaux, 1980). Cette protéine, conservée de la levure à l'Homme, s'associe avec une protéine régulatrice, la Cycline B. Le complexe s'active alors de manière transitoire pour déclencher l'assemblage du fuseau mitotique.

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, allant de la cellule humaine aux eucaryotes unicellulaires comme la levure.

Cette étape cruciale du cycle cellulaire est d'autant plus importante que des défauts durant ce processus peuvent être à l'origine de cellules possédant un nombre défectueux de chromosomes (cellule aneuploïde). On sait aussi que les cellules aneuploïdes peuvent contribuer à la formation de tumeur cancéreuse (Kops et al., 2005).

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

- la **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, appelés centrosomes chez les eucaryotes supérieurs, se séparent afin de former le fuseau mitotique.

Note: certains fuseaux mitotiques, comme chez les plantes, sont formés en l'absence de pôles (« *acentrosomal spindle formation* » en anglais). Ce type de division très particulier ne sera pas discuté dans ce travail de thèse.

- la **prométaphase** : la membrane nucléaire se désassemble dans le cas d'une mitose ouverte (Boettcher and Barral, 2013) tandis qu'elle reste intacte dans les mitoses fermées (répandues chez les protistes et organismes unicellulaires). A ce stade chaque chromatide possède une région centromérique d'une longueur variable selon les organismes allant de quelques centaines de paires de bases, comme chez la levure à bourgeon, à plusieurs millions comme chez les cellules humaines (Black and Bassett, 2008). Le centromère est composé d'un variant de l'histone H3 (Cnp1p chez *S. pombe* et CENP-A chez la plupart des mammifères) qui permet l'assemblage du kinétochore. C'est le kinétochore qui permet l'attachement des chromosomes aux microtubules.
- la **métaphase** : les chromosomes alors attachés aux pôles par l'intermédiaire des microtubules viennent se positionner à l'équateur de la cellule pour former la plaque métaphasique. Cette étape cruciale de la mitose est régulée par des points de contrôle qui détectent la présence de chromosomes mal attachés et retardent le passage à l'étape suivante (Section 1.3.4).
- la **anaphase** : durant l'anaphase A et grâce à l'activation de l'APC, le complexe cohésine reliant les chromatides sœurs est dégradé (Guacci et al., 1997; Oliveira et al., 2010). Cela conduit au mouvement de chaque chromatide vers son pôle respectif grâce à la dépolymérisation des microtubules au cours de l'anaphase A. A l'anaphase B, le fuseau mitotique s'allonge, éloignant alors les pôles du fuseau et les chromosomes loin du centre de la cellule. On notera que ces deux phases peuvent être distinctes ou pas selon le type cellulaire étudiée.
- la **télophase** : les microtubules kinétochoriens se détachent, les chromosomes se décondensent et retournent à leur état initial de brins d'ADN. L'enveloppe nucléaire se reforme dans le cas d'une mitose ouverte.
- la **cytocinèse** : à ce stade, la mitose est finie. Durant cette période, la cellule va alors se diviser grâce à la formation d'un anneau d'acto-myosine contractile qui s'invagine jusqu'à « couper » la cellule mère en deux cellules filles.

On voit bien à travers la description des différentes étapes de la mitose que l'une des caractéristiques essentielles des chromosomes est leur capacité à se mouvoir dans la cellule de façon coordonnée à la fois dans le temps et dans l'espace.

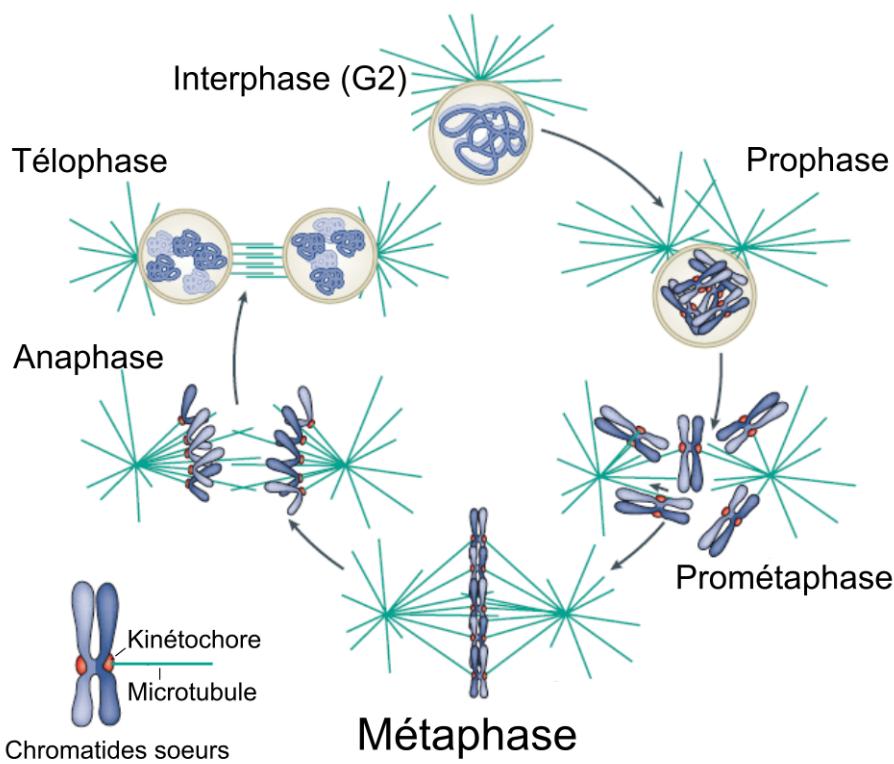


Figure 1.3: Les différentes étapes de la mitose (adapté de Cheeseman and Desai (2008)). Durant les cinq phases de la mitose la cellule établit un fuseau mitotique par séparation de ses deux pôles (en vert) puis doit répartir la même quantité de chromosomes (en bleu) vers chacun des pôles.

Nous allons à présent voir qu'un grand nombre d'acteurs sont nécessaires afin de produire et réguler ce mouvement.

1.2.2 Le kinétochore

Le kinétochore est constitué de multiples complexes protéiques (jusqu'à 80 protéines chez les cellules humaines) dont l'assemblage se situe sur la partie centromérique des chromatides au niveau des variants d'histone H3 (appelé CENP-A).

Il est composé de deux régions (Figure 1.4) :

- **la plaque interne** qui s'associe de manière très spécifique avec la chromatine centromérique par l'intermédiaire entre autre de l'histone CENP-A.
- **la plaque externe**, épaisse de 50 à 60nm qui est responsable des interactions avec le fuseau mitotique, notamment les microtubules kinétochoriens. Cette région possède des sites d'ancrage pour les microtubules permettant le mouvement des chromosomes durant la mitose. Le nombre de site d'ancrage varie fortement d'une espèce à une autre allant d'une quarantaine chez l'humain à seulement un site d'attachement pour la levure à bourgeon (Richard McIntosh et al., 2013).

Le kinétochore s'assemble durant la prométaphase et joue plusieurs rôles importants au cours de la mitose. En plus d'être un acteur essentiel dans le bon déroulement du point de contrôle de la transition métaphase/anaphase (le SAC), il joue aussi un rôle structurel dans l'attachement entre le chromosome et les microtubules.

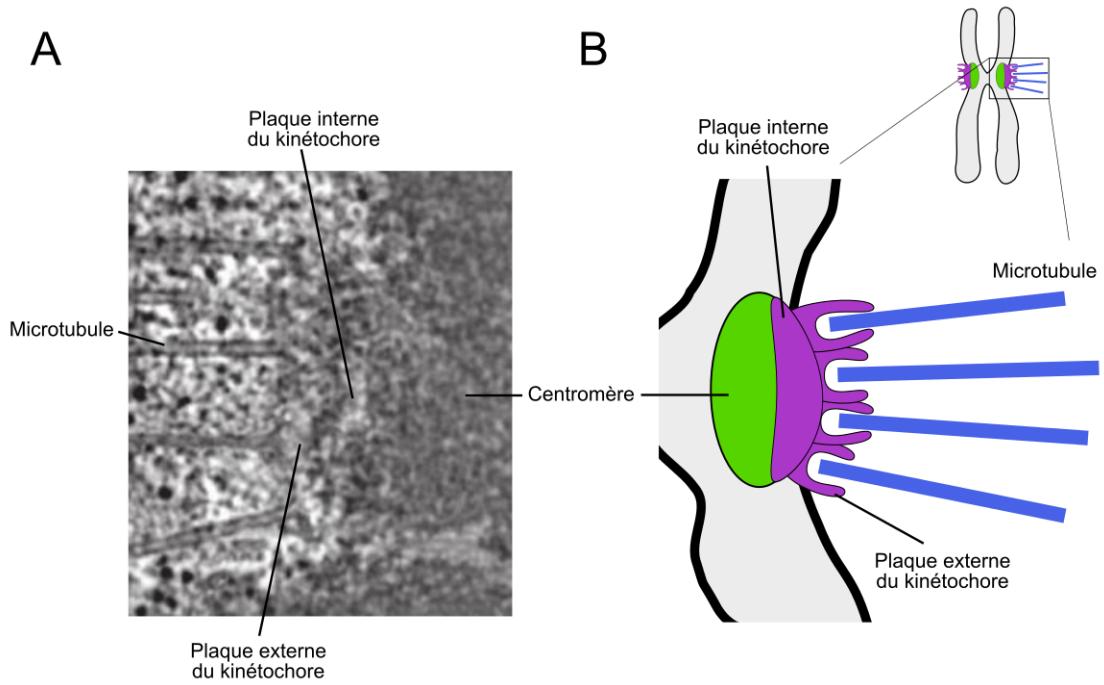


Figure 1.4: Structure d'un kinétochore. **A.** Vue d'un kinétochore humain de côté par microscopie électronique (McEwen et al. (2007)). **B.** Schéma des différentes plaques d'un kinétochore

1.2.3 Les microtubules

Les microtubules sont l'un des constituants majeurs du cytosquelette. Ce sont des structures de forme tubulaire d'un diamètre de 20nm et d'une longueur très variable pouvant aller jusqu'à plusieurs micromètres. Ils sont formés de dimères de tubuline, eux mêmes composés de deux sous unités, la tubuline α et la tubuline β .

La formation d'un microtubule requiert un complexe protéique qui joue le rôle de patron de construction, constitué de la tubuline γ , identifiée initialement chez *Aspergillus nidulans* (Oakley and Oakley, 1989; Oakley et al., 1990; Zheng et al., 1995). Celui-ci forme un anneau permettant la disposition de chaque protofilament tel que présenté Figure 1.5A. L'extrémité plus est coiffée de dimère GTP et c'est son hydrolyse en GDP qui permet l'assemblage des protofilaments.

Par ailleurs, le microtubule est un polymère extrêmement dynamique dont les extrémités passent leur temps à basculer entre deux états : la polymérisation (ou assemblage) et la dépolymérisation (ou désassemblage) (voir Figure 1.5B). Les deux extrémités étant chargées différemment en GTP et GDP, elles possèdent une dynamique plus ou moins importante. On parle d'extrémité plus pour celle chargée en GTP et donc très dynamique (coiffée par la tubuline β) et d'extrémité moins pour celle chargée en GDP donc moins dynamique (coiffée par la tubuline α).

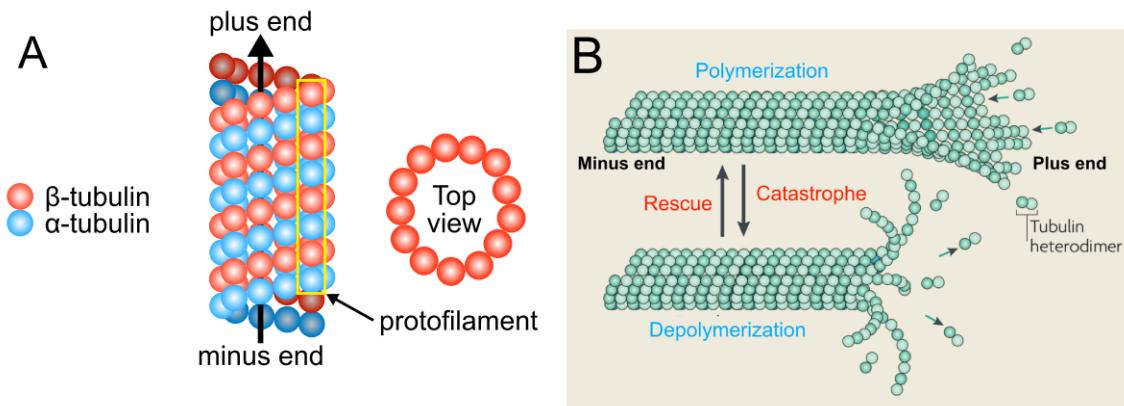


Figure 1.5: Structure et dynamique du microtubule. **A.** Schéma présentant l'organisation d'un microtubule. **B.** Les microtubules sont des structures hautement dynamiques qui passent très souvent d'un état à un autre (Walczak et al., 2010).

Les microtubules, et d'une manière plus générale l'ensemble des protéines du cytosquelette, participent au maintien de la forme tridimensionnelle de la cellule (Mata and Nurse, 1997). De plus, elles participent aussi de manière active au processus de migration cellulaire ou de transport intra-cellulaire. C'est ainsi qu'il est possible d'apprécier la grande diversité de formes et d'élasticité des cellules composant l'ensemble des organismes connus.

Les microtubules sont aussi connus pour leur rôle dans le transport cytoplasmique de divers composants tels que des vésicules ou autres grandes protéines (Vale, 2003). En effet leur polarité et leur grande rigidité permettent un déplacement sur de longues distances et de manière dirigée (Hirokawa, 1998). Par exemple, les neurones contiennent un grand nombre de microtubules nécessaires aux déplacements de nombreuses protéines soit vers les prolongements cellulaires ou bien vers le corps cellulaire (Goldstein and Yang, 2000).

Le transport est rendu possible grâce à des protéines associées aux microtubules (appelées Microtubules-Associated Proteins ou MAPs en anglais). Par exemple, les moteurs moléculaires sont des MAPs très connus et étudiés. Parmi eux, les kinésines se déplacent souvent vers l'extrémité plus des microtubules, même si il existe de nombreuses exceptions (pour revue voir Hirokawa et al. (2009)). Les dynéines, découvertes dans les années 1960 (Gibbons and Rowe, 1965), se déplacent vers l'extrémité moins des microtubules.

Enfin le rôle des microtubules dans la mobilité cellulaire est aussi très étudié. Ce sont par exemple les composants majeurs de l'axonème qui forment les flagelles des cellules eucaryotes (spermatozoïdes et certains protistes).

Pour finir, on soulignera leur importance capitale durant la mitose car ce sont eux qui forment l'essentiel du fuseau mitotique. En plus d'un rôle structurel durant la division

cellulaire, ils y participent aussi de manière active en fournissant une partie de l'énergie nécessaire au déplacement des chromosomes.

Un grand nombre de molécules et de protéines sont capables de modifier la dynamicité des microtubules. Notamment, des protéines de la famille des kinésines sont connues pour induire la dépolymérisation des microtubules pendant la mitose.

1.2.4 Les kinésines dépolymérisatrices des microtubules

Les kinésines sont classifiées en une quinzaine de familles plus ou moins liées par la structure de leur domaine moteur qui est conservée au cours de l'évolution (Dagenbach and Endow, 2004).

Les premières études sur la famille des kinésines dépolymérisatrice des microtubules ont commencé dans les années 1990 (pour revue voir Walczak et al. (2013)). La kinésine-13 fut la première à être décrite comme une kinésine qui induit un désassemblage des microtubules. Par exemple, la déplétion de la kinésine-13 dans des extraits d'œufs de *Xenopus* (appelé XKCM1) a pour effet d'augmenter la taille des microtubules qui présentent par ailleurs un taux de catastrophe plus bas (Walczak et al., 1996). Par la suite la kinésine-13 a été retrouvée dans de nombreux organismes pour lesquels son rôle dans la déstabilisation des microtubules a été démontré (Ganem et al., 2005; Maney and Hunter, 1998).

Étonnamment personne ne retrouva la kinésine-13 chez les champignons et c'est au début des années 2000 que la kinésine-8 fut décrite chez la levure. Chez la levure à fission (*Schizosaccharomyces pombe*), la déplétion de la kinésine-8 (appelée Klp5 et Klp6) entraîne un allongement des microtubules cytoplasmiques ainsi qu'un défaut dans l'alignement des chromosomes en métaphase (Garcia et al., 2002; West et al., 2002). Tandis que chez la levure à bourgeon (*Saccharomyces cerevisiae*), les cellules mutantes pour la kinésine-8 (Kip3) présentent un défaut de positionnement du noyau (Cottingham and Hoyt, 1997). D'une manière plus générale, de nombreuses études ont montré que la kinésine-8 est localisée à l'extrémité plus des microtubules kinétochoriens et que sa délétion entraîne un allongement du fuseau mitotique, un décentrage des chromosomes ainsi qu'un délai d'entrée en anaphase dû à l'activation du SAC (Goshima et al., 2005; Jaqaman et al., 2010; Mayr et al., 2007; Stumpff et al., 2008; Wargacki et al., 2010).

Une étude phylogénique suggère que la majorité des cellules eucaryotes possèdent au moins un gène codant pour l'une des deux kinésines dépolymérisatrices (Wickstead and Gull, 2006). Il a même été montré qu'un parasite protozoaire (*Theileria annulata*) ne possède que deux kinésines: la kinésine-8 et la kinésine-13. Tout ceci révèle l'importance fon-

damentale qu'ont ces kinésines dépolymérisatrices dans la dynamique des microtubules.

Par ailleurs, l'analyse de la structure 3D de ces deux kinésines (Ogawa et al., 2004; Peters et al., 2010) montre une très forte similarité dans l'agencement spatial des brins et des hélices les composant (Figure 1.6), ce qui suggère des activités catalytiques similaires.

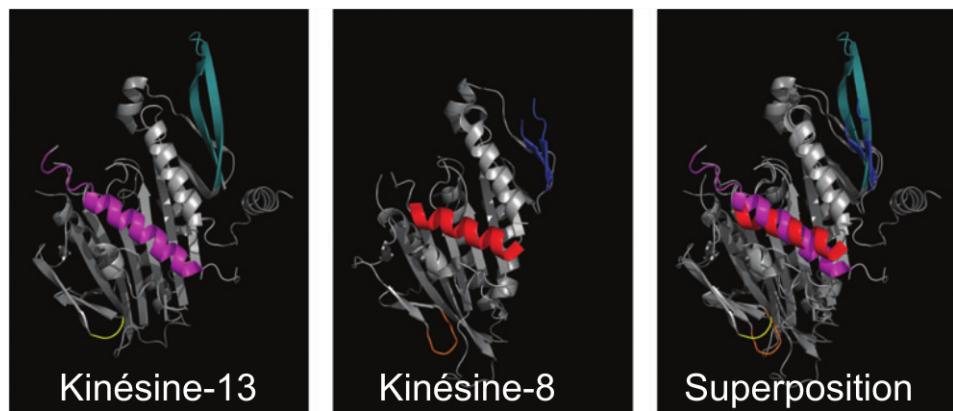


Figure 1.6: Vue en trois dimensions de la kinésine-13 (MCAK) et de la kinésine-8 (Kif18a) chez l'humain. La troisième vue montre une superposition des deux protéines. Les domaines importants qui participent à la liaison avec le microtubule : la boucle 2 appelée le KVD finger (cyan et bleu) et la boucle 8 (en jaune et orange). La superposition montre la similarité de ces domaines chez les deux kinésines (Walczak et al., 2013).

On notera aussi la grande conservation des domaines protéiques qui composent la kinésine-8 chez un grand nombre d'organismes (cellule humaine, levure à bourgeon, levure à fission, cellule de drosophile) comme le montre la Figure 1.7.

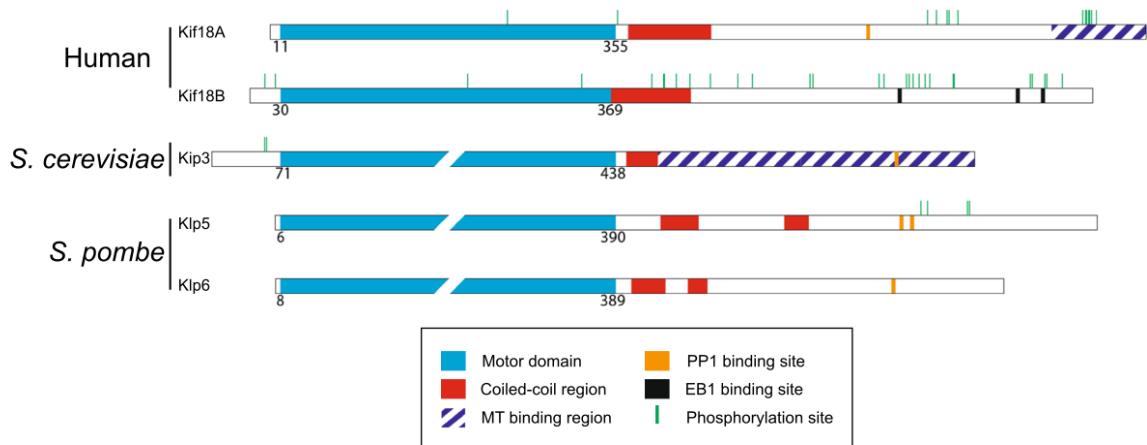


Figure 1.7: Vue schématique des domaines protéiques composant la kinésine-8 chez la cellule humaine, la levure à bourgeon et la levure à fission (Messin and Millar, 2014).

Si les kinésines dépolymérisatrices influencent le comportement de l'attachement entre le microtubule et le kinétochore, il n'a pas été montré qu'elles jouaient clairement un rôle

dans l'attachement. Celui-ci dépendrait plutôt de protéines spécifiques du kinétochore qui permettent l'ancrage du microtubule, ainsi que le maintien de l'attachement.

1.2.5 L'ancrage du microtubule au kinétochore

Durant la mitose, les microtubules attachent les chromosomes par l'intermédiaire d'une grande structure protéique appelée le kinétochore. L'attache se situe au niveau de la plaque externe du kinétochore et implique principalement le complexe NDC80 (DeLuca et al., 2002, 2006; McCleland et al., 2004; Wigge and Kilmartin, 2001).

Ce complexe est un hétérotétramère composé des protéines : Ndc80, (Hec1 chez l'humain), Nuf2, Spc24 et Spc25 (Wei et al., 2005) (voir Figure 1.8A). L'une des extrémités qui possède un domaine pouvant s'attacher au microtubule est composée de Ndc80-Nuf2 tandis que l'autre extrémité, Spc25-Spc24, possède un domaine s'attachant à la plaque externe du kinétochore.

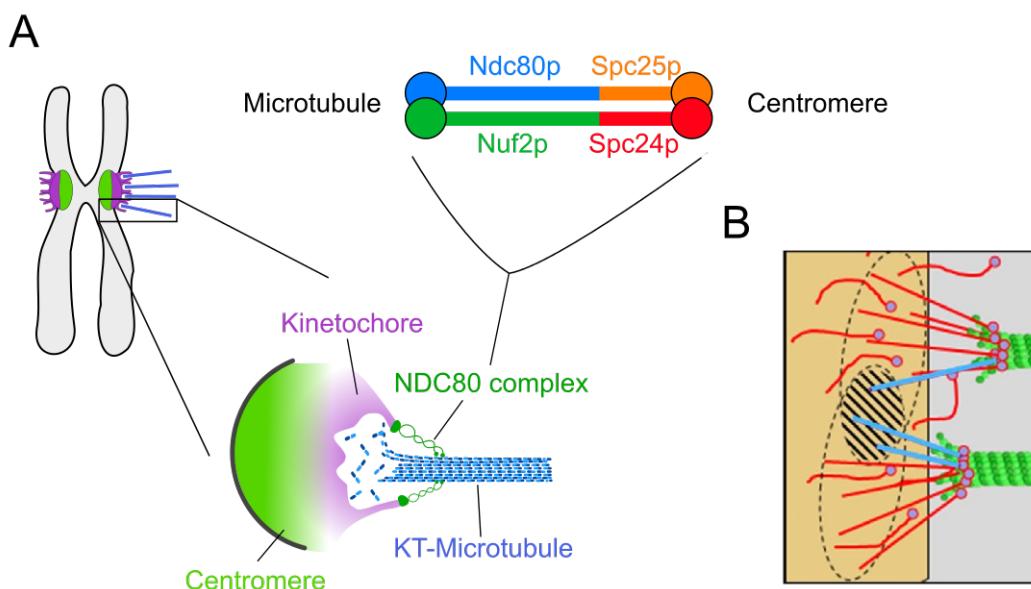


Figure 1.8: Stucture de l'attachement kinétochore-microtubule. **A.** Vue schématique de la structure du complexe NDC80 ainsi que sa localisation dans le kinétochore. **B.** Interaction non contrainte entre des complexes NDC80 (en rouge) avec différents microtubules (en vert) (Zaytsev et al., 2014).

Plus récemment J.G DeLuca et al. ont proposé un modèle continu de l'attachement des microtubules au kinétochore (Zaytsev et al., 2014). En effet les sites d'attachement ne sont plus vus comme un ensemble d'éléments discrets, mais comme une surface sur laquelle les attachements se font de manière non exclusive (voir Figure 1.8B).

Une autre protéine est connue pour son rôle dans l'attachement du microtubule au kinétochore. La protéine Dam1 ou DASH a été pour la première fois identifié chez la

levure à bourgeon comme une protéine cruciale pour le maintien de l'intégrité structurelle du fuseau mitotique (Hofmann, 1998)

Par la suite, il a été montré **in vitro** que des complexes de DAM1 pouvaient former des structures en anneaux (Westermann et al., 2005) autour des microtubules (Figure 1.9).

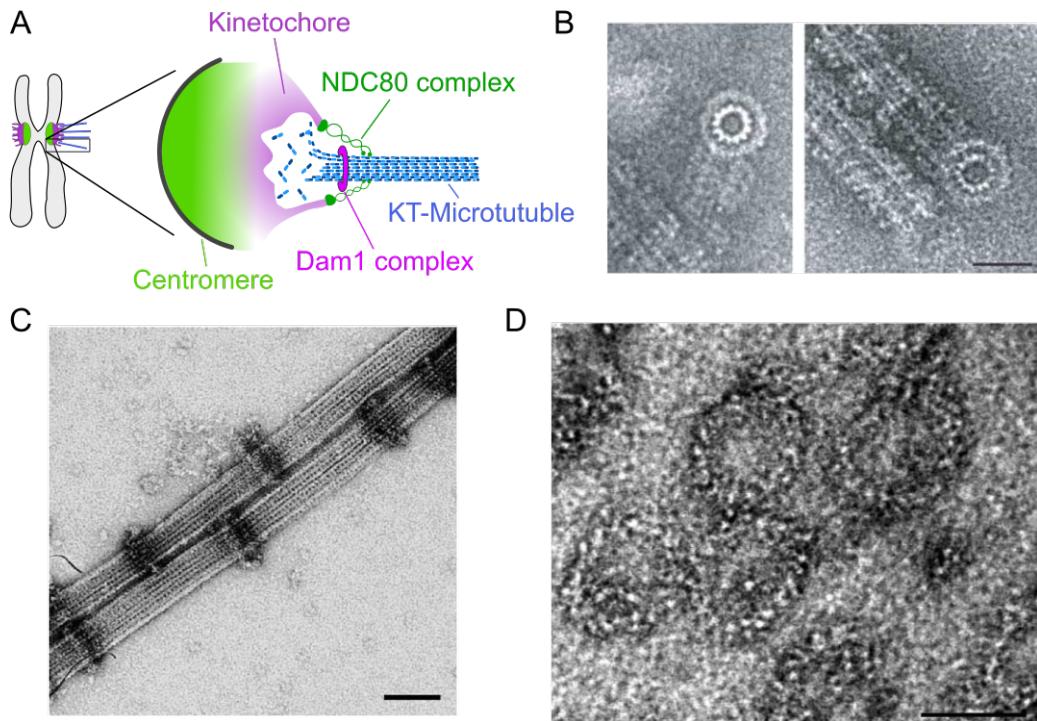


Figure 1.9: Structure du complexe DAM1. **A.** Schéma de la structure et du positionnement du complexe DAM1 lorsqu'il forme un anneau autour du microtubule. **B.** Exemple d'une image de microscopie électronique (EM) montrant une vue de l'extrémité finale d'un microtubule entourée d'un complexe DAM1 (Westermann et al., 2006). **C.** Complexes DAM1 purifiés et attachés à des microtubules stabilisés par du taxol et visualisés par EM (Westermann et al., 2005). **D.** Complexes DAM1 incubé 48h dans une monocouche phospholipidique et visualisé par EM. Des anneaux auto-assemblés de complexe DAM1 sont visibles. Les barre d'échelle correspondent à 50nm.

Cependant c'est dans une autre étude que le rôle essentiel du complexe DAM1 dans l'attachement kinétochore-microtubule fut décrit (Westermann et al., 2006). En effet les auteurs ont montré (Figure 1.9) par vidéo-microscopie à fluorescence que des anneaux de DAM1 peuvent se déplacer vers l'extrémité plus d'un microtubule sur plusieurs micromètre sans se détacher. Ils proposent alors que la protéine Dam1 joue un rôle important dans l'attachement kinétochore-microtubule et agit comme un système capable de convertir l'énergie mécanique générée par un microtubule en une force appliquée sur le kinétochore afin de générer un mouvement.

Des oligomères de Dam1 de plus petite tailles sans structure en anneau ont aussi été identifiées **in vitro** chez la levure à bourgeon (Gestaut et al., 2008). Ces assemblages

appelés « patchs » sont cependant capables de diffuser le long du microtubule ainsi que de suivre son extrémité pendant sa dépolymérisation (Gestaut et al., 2008).

La protéine Dam1 est conservée chez la levure à fission et est essentielle pour la ségrégation fidèle des chromosomes (Sanchez-Perez et al., 2005). Elle est localisé de la même façon que son homologue de la levure à bourgeon au niveau des kinétochères et à l'extrémité des microtubules nucléaires. Cependant une étude *in vivo* a montré par microscopie quantitative que seulement 7-8 copies de Dam1 en moyenne étaient présent au kinétochore (Gao et al., 2010). Les auteurs proposent donc que Dam1 est capable de modifier la dynamique des microtubules kinétochoriens sans structure en anneaux mais plutôt à travers des « patchs » de petite tailles.

Une autre étude montre aussi que Dam1 est capable de former des patchs **in vitro** lorsque sa concentration est très faible de l'ordre de 500pM (Tien et al., 2010).

Bien que Dam1 soit absent chez les eucaryotes supérieurs, la protéine Ska1 chez l'humain pourrait être l'homologue fonctionnel de Dam1 (Schmidt et al., 2012). Différentes études ont été en mesure de montrer que les complexes Ska1 et NDC80 forment un système intégré capable de coupler le mouvement des chromosomes à la dépolymérisation des microtubules (Daum et al., 2009; Gaitanos et al., 2009; Hanisch et al., 2006; Raaijmakers et al., 2009; Schmidt et al., 2012; Theis et al., 2009; Welburn et al., 2009).

1.2.6 Les différents types d'attachements

L'association des kinétochères frères avec leurs pôles respectifs s'appelle un attachement amphitétrique, on parle aussi de chromosomes biorientés (voir Figure 1.10). Il a été montré que les erreurs d'attachement sont fréquentes en prométaphase et qu'elles sont pour la plupart corrigées avant le début de la séparation des chromosomes, l'anaphase.

On distingue trois types d'erreurs dans les attachements KT-MT (voir Figure 1.10):

- **monotérique** : seulement un des deux kinétochères est attaché à des MTs provenant tous du même pôle.
- **syntérique** : les deux kinétochères sont associés à des MTs provenant du même pôle.
- **mérotérique** : un kinétochore est associé à des MTs provenant des deux pôles à la fois.

Un attachement incorrect des kinétochères durant l'anaphase peut entraîner une perte de chromosome et par la suite la mort cellulaire (King and Cidlowski, 1995) ou bien

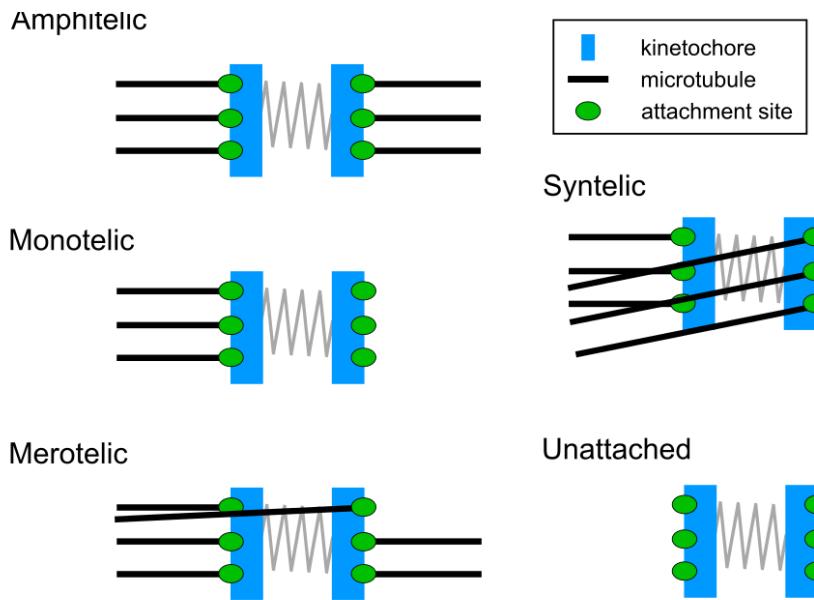


Figure 1.10: Les différents types d'attachments des microtubules (noir) aux kinétochores (vert). Le seul attachment correct pour le fuseau mitotique est l'attachment amphitélisque aussi appelé attachment bi-orienté. Les autres attachments sont généralement corrigés durant la mitose.

la dégénérescence d'un tissu. La cellule a donc développé des mécanismes robustes de correction.

D'abord de manière purement géométrique, suite au processus de réplication et de condensation, les deux kinétochores frères sont placés dos à dos dans des directions opposées. Il en résulte que si l'un des kinétochores est accroché à un pôle, l'autre kinétochore sera alors plus susceptible de s'associer avec le pôle opposé.

Dans les années 90, Nicklas et al. montrèrent dans un expérience de micromanipulation sur des chromosomes de spermatocyte de sauterelle, que l'attachment KT-MT est par nature instable et qu'il se stabilise à mesure que la tension augmente (Nicklas et al., 1982). De façon étonnante, lorsqu'il appliqua artificiellement à l'aide d'une micro-aiguille en verre une tension mécanique à un chromosome métaphasique attaché à un seul pole, Li et Nicklas observèrent que l'établissement de cette tension supprimait le signal d'inhibition venant du chromosome et déclenchaît l'anaphase. Cette découverte établissait pour la première fois que l'anaphase n'était déclenchée que lorsque tous les chromosomes étaient soumis à une tension mécanique (Nicklas et al., 1995).

Par ailleurs, des expériences de microdissection au laser sur des chromosomes en métaphase (Skibbens et al., 1995) ont montré que les deux chromatides sœurs se déplacent vers leurs pôles respectifs après ablation de leur région centrale, ce qui indique que l'attachment d'un microtubule à un kinétochore produit une force dans la direction du pôle qui attache le microtubule. Par conséquent, un chromosome amphitélisque, correcte-

ment attaché, est nécessairement sous tension tandis que les attachements monotéliques ou syntéliques doivent subir une tension plus faible. Ainsi les attachements incorrects devraient être éliminés avec le temps tandis que les attachements corrects auraient tendance à être maintenus jusqu'au début de l'anaphase (Kirschner and Mitchison, 1986).

Un des mécanismes proposés pour expliquer l'instabilité des attachements incorrects, sous une moindre tension, est basé sur l'activité d'une protéine kinase appelée Aurora B et localisée au centre du centromère (Carmena et al., 2012). La phosphorylation de certaines protéines du kinétochore par Aurora B réduit l'affinité de l'attachement du kinétochore aux microtubules (DeLuca et al., 2006). Comme présenté sur la Figure 1.11, si la distance entre les deux kinétochères est grande, due à une tension élevée, Aurora B n'aurait pas accès aux protéines du kinétochore et ne pourrait donc pas déstabiliser l'attachement en déphosphorylant ces substrats (Tanaka et al., 2002).

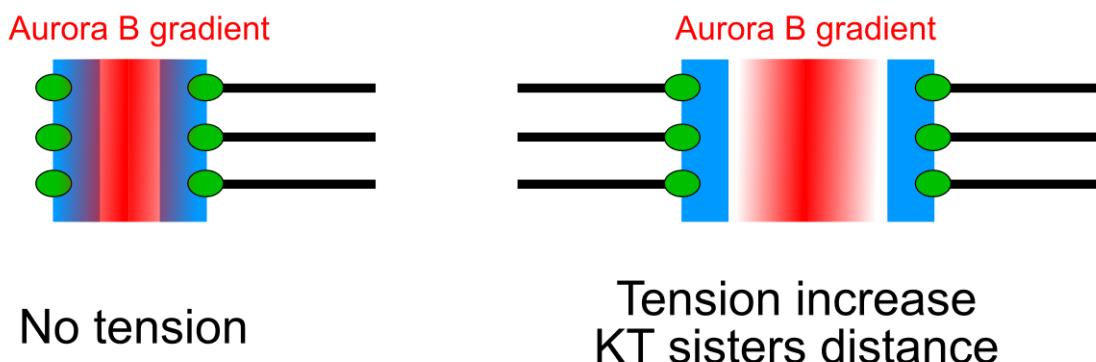


Figure 1.11: Le mécanisme de déstabilisation de l'attachement KT-MT. Quand les deux kinétochères frères sont éloignés (schéma de droite), le gradient d'Aurora B ne peut pas atteindre les protéines du kinétochore (en vert) et donc déstabiliser l'attachement KT-MT.

Ce modèle du positionnement d'Aurora B au centre du kinétochore et établissant un gradient de concentration est encore controversé. Des études proposent des mécanismes alternatifs où Aurora B serait localisé directement sur le kinétochore (Campbell and Desai, 2013).

Un mécanisme alternatif propose une correction structurelle en provoquant un déséquilibre de force présent en anaphase sur le kinétochore mérotélique et implique les forces responsables de l'elongation du fuseau (Courtheoux et al., 2009).

Pour permettre la correction des défauts d'attachement, la cellule possède un point de contrôle afin de mettre la mitose « en pause » avant l'entrée en anaphase.

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

La métaphase correspond au moment où l'ensemble des chromatides sœurs sont encore attachées entre elles par la cohésine et alignées au milieu du fuseau mitotique entre les deux pôles (Figure 1.12).

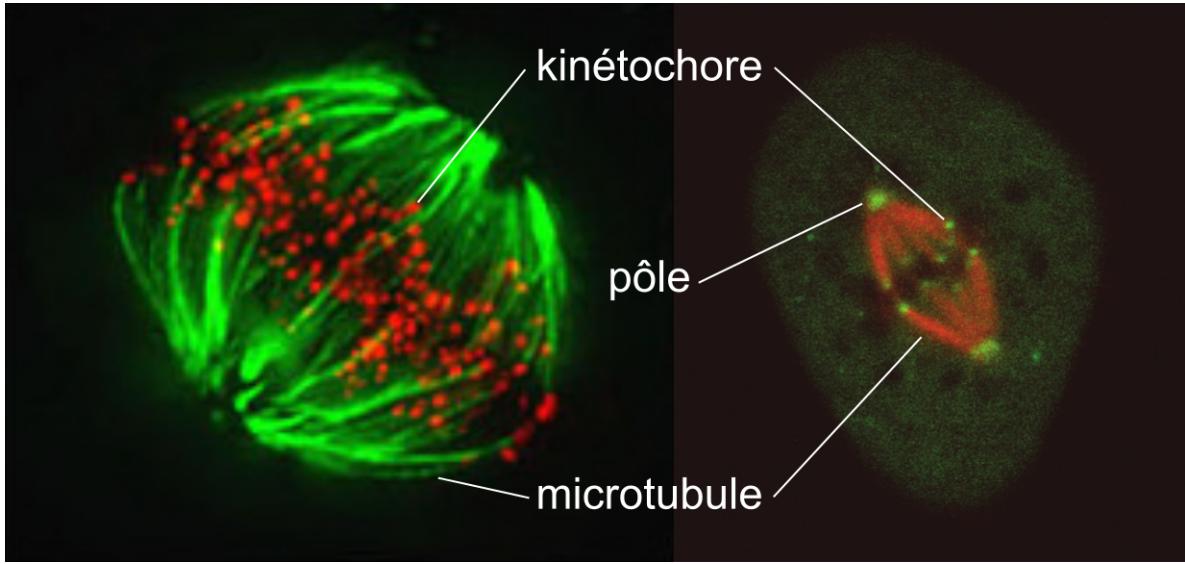


Figure 1.12: Deux cellules en métaphase (cellule HeLa à gauche et cellule Ptk1 à droite). Pour les deux cellules les kinétochores de l'ensemble des chromosomes sont marqués respectivement en rouge et vert tandis que les microtubules sont marqués respectivement en vert et rouge. (Huang et al., 2008; Wan et al., 2012)

1.3.1 La congression des chromosomes

L'étape d'alignement des chromosomes aussi appelée congression prend place pendant la prométaphase. Une cellule passe donc du temps et dépense de l'énergie à regrouper et aligner ses chromosomes entre les deux pôles du fuseau mitotique.

Bien que les mécanismes évolutifs responsables de la mise en place de l'alignement des chromosomes restent inconnus, on constate que dans de nombreuses cellules eucaryotes les chromosomes s'alignent pour former une plaque métaphasique. Les mécanismes impliqués dans cet alignement sont de mieux en mieux compris (voir Auckland and McAinsh (2015) pour une revue).

En début de prométaphase les chromosomes initialement non attachés commencent à se biorienter. C'est à ce moment qu'ils vont subir une série de mouvements de va et vient (aussi appelé oscillations) pour venir, petit à petit, s'aligner au niveau de la plaque équatoriale (au milieu du fuseau mitotique). On peut observer ce processus à l'œuvre en

microscopie à fluorescence en marquant les kinétochores et les microtubules d'une cellule humaine par exemple (Figure 1.13).

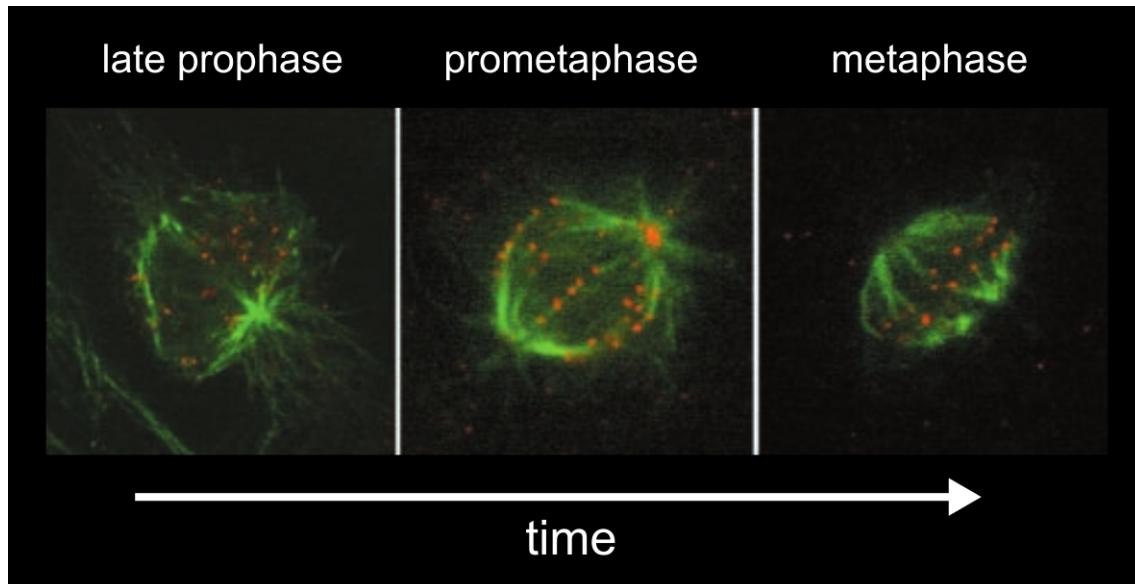


Figure 1.13: Cellule humaine (RPE1) en début de mitose. Les kinétochores (en rouge) sont alignés à la fin du processus durant la métaphase. On peut deviner les deux pôles du fuseau en suivant où les microtubules (en vert) convergent. (DeLuca et al., 2002)

L'un des modèles de congression propose que les kinétochores soient capables de « détecter » leur position au sein du fuseau afin de biaiser leurs mouvements en direction du centre du fuseau mitotique durant la mitose. Ce mécanisme implique des protéines régulatrices de la dynamique des microtubules telles que la kinésine-13 et la kinésine-8 (Walczak et al., 2013).

Par exemple, il a été montré qu'un chromosome amphithélique non aligné dans des cellules humaines accumule l'homologue de la kinésine-13, appelé MCAK, au niveau du kinétochore qui se déplace vers son pôle (on parle de « *poleward* kinetochore » ou « *kinetochore P* » en anglais), ce qui implique une dépolymérisation biaisée du microtubule et donc un mouvement plus rapide en direction du centre du fuseau mitotique (Kline-Smith et al., 2004), effet que l'on retrouve aussi lors des oscillations des chromosomes alignés sur la plaque métaphasique (Jaqaman et al., 2010). Une fois que le chromosome est positionné au niveau de la région équatorienne du fuseau, la kinésine MCAK disparaît et cet événement s'accompagne d'une réduction de la force appliquée au niveau du kinétochore P.

Une autre étude montre que dans des cellules humaines, une accumulation de l'homologue de la kinésine-8 (Kif18A) proportionnelle à la taille du microtubule, sur le kinétochore opposé au pôle connecté (on parle de « *anti-poleward* kinetochore » ou « *kinetochore AP* » en anglais) contraint l'amplitude des oscillations des chromosomes

en augmentant le changement de direction du mouvement des chromosomes (Stumpff et al., 2012). Dans ce cas là, l'accumulation de la protéine Kif18A sur le kinétochore AP réduit la dynamique du microtubule (Du et al., 2010; Stumpff et al., 2011).

Cependant, d'autres études montrent aussi que différents facteurs pourraient établir un gradient de concentration le long du fuseau et influencer la position et le mouvement des chromosomes. Par exemple il a été montré qu'un gradient de Plk1 et Ran-GTP pouvait contrôler la position des chromosomes (Kiyomitsu and Cheeseman, 2012) et que Aurora A pourrait former un gradient au niveau des pôles du fuseau (Hochegger et al., 2013; Ye et al., 2015).

1.3.2 Le mouvement des chromosomes

Bien que la congression des chromosomes fasse intervenir des mécanismes variés et différents au cours de l'évolution, on observe à travers tout ces mécanismes un processus conservé dans l'ensemble des cellules eucaryotes : le mouvement oscillatoire des chromosomes (Armond et al., 2015; McIntosh, 2012; Skibbens et al., 1993).

Deux mécanismes sont nécessaires pour produire ce mouvement :

- En premier lieu, les kinétochores frères doivent être soumis à une force pour se déplacer. Cette force proviendrait majoritairement de l'attachement microtubules - kinétochores. Plusieurs modèles proposent différents mécanismes capables de générer une force (Civelekoglu-Scholey et al., 2006; Joglekar and DeLuca, 2009; McIntosh, 2012; Powers et al., 2009). Le modèle stipulant que l'énergie proviendrait de la dépolymérisation des microtubules et serait transmise par une protéine capable de maintenir l'attachement du kinetochore avec le microtubule qui dépolymérise (le complexe NDC80 et le complexe DAM1 possiblement) représente en fait une version moderne d'un modèle théorique établi dans les années 1980, appelé le modèle de Hill (Hill, 1985). Ces différents mécanismes sont détaillés en Section 1.4.4. Un autre mécanisme serait l'existence d'une force d'éjection polaire (PEF ou « polar ejection force » en anglais) qui pousserait les bras des chromosomes en direction de l'équateur du fuseau (Rieder and Salmon, 1994; Rieder et al., 1986; Sharp et al., 2000). Les PEFs pourraient être produites par une famille de kinésine appelé les chromokinésines (Antonio et al., 2000; Brown et al., 1996; Kwon et al., 2004; Tokai et al., 1996a) qui contrairement aux autres kinésines possèdent un domaine de liaison avec la chromatine (Tokai et al., 1996b; Wang and Adler, 1995). Cependant les chromokinésines sont absentes chez la levure à fission, ce qui démontre que

ce mécanisme n'est pas strictement requis pour générer une force et mouvoir les chromosomes.

- Une fois que le chromosome est mis en mouvement, un mécanisme doit pouvoir réguler sa dynamique afin de contraindre ses déplacements de va et vient et de favoriser le maintien de son alignement au milieu du fuseau mitotique. Ce mécanisme encore mal compris est probablement dû à la contribution de plusieurs phénomènes comme l'instabilité directionnelle des kinétochores (Skibbens et al., 1993), le « microtubule poleward flux » (Mitchison, 1989, 1992), le stretch dû au mouvement relatif des kinétochores frères (Maddox et al., 2003; Skibbens et al., 1993, 1995), le gradient de concentration de certaines protéines (Gardner et al., 2008; Jaqaman et al., 2010; Mayr et al., 2007; Stumpff et al., 2008; Varga et al., 2006) ou encore l'instabilité dynamique des microtubules (Amaro et al., 2010; Tirnauer and Canman, 2002).

L'un des phénomènes encore mal compris malgré son importance capitale est le mécanisme par lequel les deux kinétochores frères sont capable de coordonner leurs états P/AP afin de produire un mouvement régulier et synchronisé d'une paire de chromosomes.

Un modèle standard du changement de direction d'un chromosome, le « chromosome switch », a été théorisé en 1994 par l'équipe de Conly Rieder (Rieder, 1994) suite à différentes études sur le mouvement coordonné des kinétochores frères (Skibbens et al., 1993) ainsi que le rôle capital de la chromatine centromérique dans la coordination du changement de direction des chromosomes (Skibbens et al., 1995).

Ce modèle (Figure 1.14) stipule que l'augmentation de la tension entre les deux kinétochores déclenche le changement d'état du leading kinétochore en P-AP. La diminution de tension déclencherait en revanche le changement d'état AP-P du second kinétochore (le trailing kinétochore).

Des observations sur des cellules Ptk1 montrant que le switch est déclenché lorsque la distance inter-kinétochore est maximum, concorde avec ce modèle. Cependant beaucoup de questions restent encore ouvertes.

Ce modèle est en accord avec des observations effectuées sur des cellules Ptk1 qui démontrent que le « switch » est déclenché lorsque la distance inter-kinétochore est maximale (Wan et al., 2012). Cependant, de nombreuses questions restent ouvertes.

Par exemple certains chromosomes chez les eucaryotes supérieurs présentent des mouvements très instables sans oscillations apparentes (Burroughs et al., 2015; Wan et al., 2012). De plus dans les cellules HeLa, dans 30% des cas le premier kinétochore qui

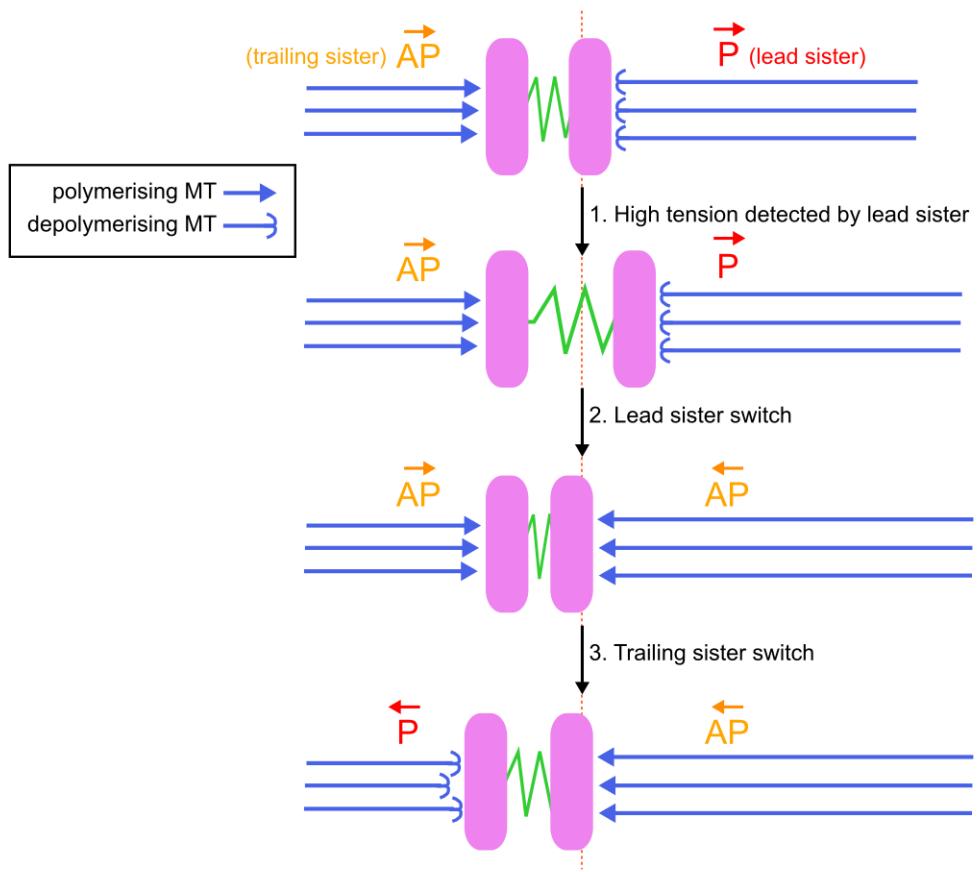


Figure 1.14: Modèle standard du changement de direction des kinétochore frères. Le leading kinétochore en se déplaçant plus vite augmente la tension et donc la distance entre les deux kinétochore. L'augmentation de tension bascule le leading kinétochore d'un état P à un état AP. Il en résulte une perte brute de tension et donc de stretch étant donné que les deux kinétochore se déplacent l'un vers l'autre. Cette relaxation déclenche alors le changement d'état du trailing kinétochore de AP en P. Les microtubules en bleu en forme de flèche représentent la polymérisation tandis que les autres microtubules sont en dépolymérisation.

switch » n'est pas le leading kinétochore mais le trailing kinétochore (Burroughs et al., 2015).

Pour finir, les propriétés du mouvement des chromosomes dans des cellules eucaryotes comme les levures, qui ne possèdent pas de chromokinésines sont encore peu connues (Stumpff et al., 2012).

Comment est il alors possible de réconcilier ces différentes observations avec le modèle standard ?

En 2015, le groupe dirigé par le Dr Mc Aintosh a proposé un nouveau mécanisme qui complète le modèle standard (Burroughs et al., 2015). Ils partent de l'observation faite que la tension seule ne pourrait expliquer le déclenchement du changement de direction. En se basant sur des observations très précises de l'évolution de la distance inter-kinétochore autour de l'événement de « switch », ils stipulent qu'une horloge régulerait le taux de catastrophe et de rescue des microtubules kinétochoriens. Cette régulation influencerait les forces exercées sur les kinétochères en mouvement et modifierait la tension entre les deux kinétochères (en accord avec le modèle standard).

Les forces exercées au niveau des kinétochères influencent la dynamique des chromosomes. Cependant ces forces jouent aussi un rôle structurel au niveau du fuseau mitotique en contre-balançant les forces générées au niveau de la zone interdigitée (Courtheoux et al., 2009; Khodjakov et al., 2004) afin de stabiliser la taille du fuseau durant la métaphase.

1.3.3 Le fuseau mitotique : un objet sous contrainte

La métaphase est un moment très particulier de la mitose car c'est le moment où le fuseau atteint un état quasi-stationnaire. À ce stade, l'appareil mitotique subit des contraintes maximales car tous les chromosomes sont attachés et soumis à des forces transmises par les microtubules des pôles du fuseau (Figure 1.15). Le complexe cohésine contrebalance ces forces appliquées aux kinétochères. De plus, les microtubules inter-digitées du fuseau mitotique produisent aussi une force d'extension au niveau du centre du fuseau opposée aux cohésines (Lansky et al., 2015). La métaphase est donc le moment où toutes ces forces s'équilibrent entre elles. Le fuseau est dans un état d'attente qui sera rompu aussitôt que l'équilibre des forces est brisé par la dégradation de la cohésine sonnant alors le début de l'anaphase.

Pour donner une idée des forces en jeu, Nicklas a mesuré *in vivo* dans des spermatocytes de criquet (*Melanoplus sanguinipes*) que la force maximale que pouvait supporter un chromosome était de l'ordre de 700 pN (Nicklas, 1983), ce qui correspond à une force approximative de 10-15 pN par microtubule. Le maintien de la stabilité mécanique du

fuseau métaphasique subissant de telles contraintes est encore mal compris. Cependant de récentes techniques de purification et de reconstruction des protéines du kinétochore *in vitro* permettent de mesurer des forces de l'ordre de 11 pN dans de tels systèmes (Akiyoshi et al., 2010a; Gonen et al., 2012).

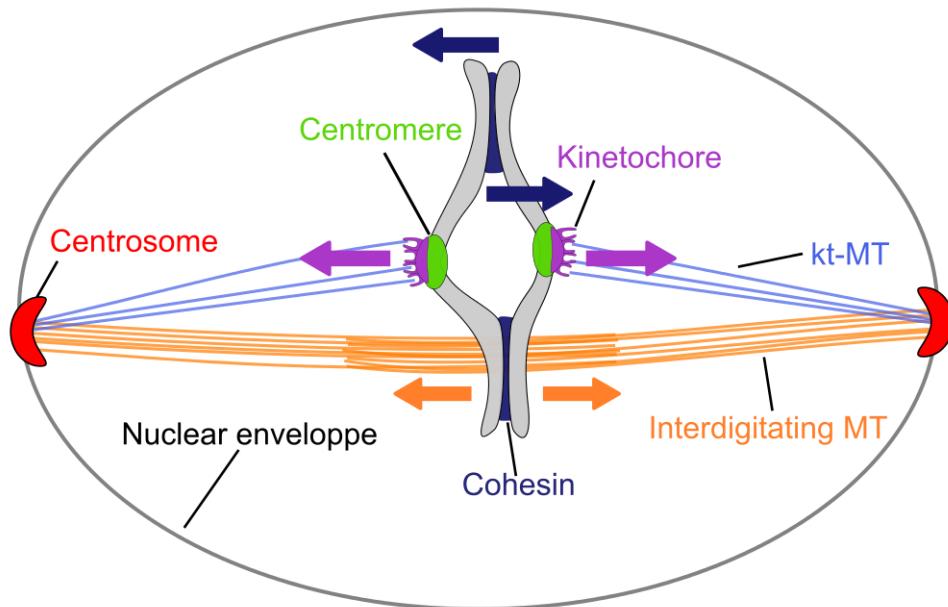


Figure 1.15: Schéma d'un fuseau mitotique en métaphase (mitose fermé). Les forces appliquées au niveau des kinétochères (flèches mauves) sont contrebalancées par la cohésine (flèches bleues). Les forces produites au niveau de la zone inter-digittée (flèches oranges) participent à l'allongement du fuseau mitotique.

1.3.4 Le point de contrôle de la transition métaphase/anaphase

Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (« Spindle Assembly Checkpoint » ou SAC en anglais) maintient la stabilité génomique en retardant la division cellulaire jusqu'à ce que tous les attachements soit corrects (voir Lara-Gonzalez et al. (2012) pour une revue). Quand un attachement est incorrect (Figure 1.10), il y a activation du SAC et blocage du cycle cellulaire.

Jusqu'à la métaphase les chromatides sœurs sont maintenues entre elles par un complexe protéique appelé la cohésine (Nasmyth and Haering, 2009). C'est la dégradation de la cohésine qui marque l'entrée en anaphase. En effet, une fois le lien entre les chromatides sœurs disparu, chacune des chromatides migre en direction du pôle vers lequel elle est attachée.

Lorsque tous les kinétochères sont attachés de manière stable, alors le SAC est satisfait et une cascade biochimique dégrade le complexe cohésine (Figure 1.16).

Les kinétochores non-attachés génèrent un signal « ON » à l'attention du SAC en recrutant un complexe protéique composé principalement de quatre protéines Mad2, BubR1, Bub3 et Cdc20 (Sudakin et al., 2001) appelé le « Mitotic Checkpoint Complex » (MCC) (Figure 1.16). Le MCC séquestre la protéine Cdc20, une fois le SAC satisfait Cdc20 active l'APC/C qui est une E3 ubiquitine ligase ciblant des protéines du cycle cellulaire (le complexe Cdk1/cycline B) afin de les dégrader par protéolyse (Bernard et al., 2001; Irniger et al., 1995; Pines, 2011). L'une des cibles de l'APC/C est la sécurine qui inhibe la protéine capable de cliver la cohésine appelée la séparase (Figure 1.16).

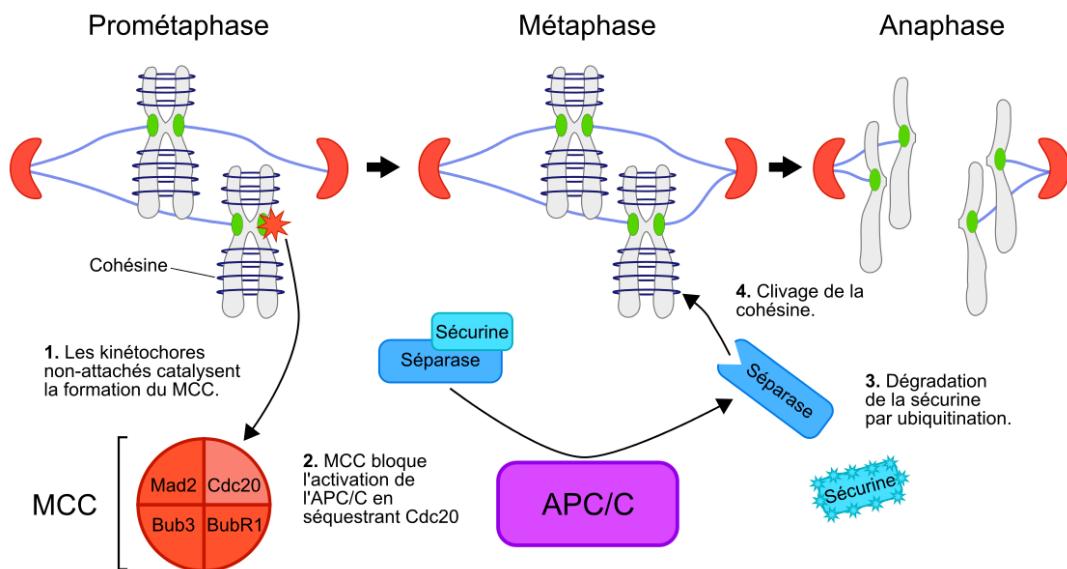


Figure 1.16: Le mécanisme d'action du SAC. Les chromosomes non-attachés catalysent la formation du MCC au niveau du kinétochore. Le MCC bloque l'activité de l'ubiquitine ligase APC/C. Une fois tous les kinétochores correctement attachés, l'APC/C dégrade la sécurine, ce qui active la séparase qui clive le complexe protéique de la cohésine.

Chez les cellules de mammifères le point de contrôle de la mitose est si sensible qu'un seul kinétochore non attaché peut retarder le déclenchement de l'anaphase de plusieurs heures (Ault and Rieder, 1994). Le recrutement du MCC et en particulier de Mad2 au kinétochore reste encore un sujet controversé. En effet, il n'est pas clair si le recrutement est dû à l'absence de microtubule kinétochorien ou au manque de tension engendré par un kinétochore non attaché. Des études semblent montrer que le point de contrôle peut être satisfait même sans tension entre le kinétochore et le centromère (O'Connell and Lončarek, 2008; Yang et al., 2009).

La façon dont les kinétochores non-attachés recrutent le MCC implique un réseau complexe de protéines situées au niveau du kinétochore. Pour une revue détaillée voir Musacchio and Salmon (2007).

Le réseau métabolique, dont fait partie le SAC, peut être modélisé comme une cascade de réactions chimiques (voir Novak and Tyson (1995) pour un exemple de modélisation

chez la levure à fission). Ce type de problème dynamique est souvent modélisé à l'aide d'un système d'équations différentielles. Bien que les modèles de réseaux métaboliques puissent prendre en compte la dimension spatiale des processus étudiés en compartimentant les réactions, il manque la prise en compte d'une réelle géométrie de la cellule ou des objets la composant.

1.4 Modélisation mathématique de la mitose

La mitose est un processus qui fascine depuis longtemps les biologistes mais aussi les scientifiques en dehors des sciences du vivant. Les physiciens s'intéressent aux propriétés mécaniques du fuseau mitotique ainsi qu'aux forces mises en jeu durant ce processus. Tandis que les mathématiciens sont plus concernés par le développement d'un modèle mathématique universel qui pourrait décrire la mitose.

1.4.1 Que signifie « modéliser un processus biologique » ?

La modélisation est un vaste champ de recherche et il existe une grande variété de classes de modèle. Les expériences de modélisation effectuées durant ce travail et d'une manière plus générale, les modèles mathématiques utilisés en biologie cellulaire pour décrire la mitose sont « des modèles de connaissance ». C'est à dire qu'ils sont tous construits à partir d'une analyse physique, biologique et chimique des connaissances existantes sur la mitose.

Un modèle de connaissance est bâti à la fois sur un ensemble de lois générales (mécanique, électromagnétisme, thermodynamique, etc.) ainsi que sur un ensemble de lois empiriques qui gouvernent les différents phénomènes du processus étudié.

C'est la classe de modèle par excellence car les équations le composant décrivent directement les processus en jeu. Cependant certains phénomènes très complexes ne peuvent pas toujours être modélisés par cette approche. On utilise donc parfois une autre classe de modèle (comme les modèles de « boîtes noires », non discutés ici). On notera qu'il est aussi possible d'appliquer une série d'approximations afin de réduire la complexité du processus étudié et ainsi d'utiliser un modèle de connaissance, au prix d'une précision moins importante (on parle alors de modélisation gros grain) (Mogilner et al., 2006).

Avant de continuer, il est important de répondre à une question primordiale qui revient souvent chez les biologistes : pourquoi modélise-t-on ?

Un scientifique tire des conclusions en fonction des différents résultats produits par ses expériences. Une déduction logique lui permet donc de bâtir un « modèle » qualitatif du

processus qu'il étudie. Ce modèle est parfois représenté sous la forme d'un schéma à la fin d'un article ou d'une présentation.

Un modèle mathématique est la version quantitative de ce modèle-schéma décrivant un processus biologique (Figure 1.17).

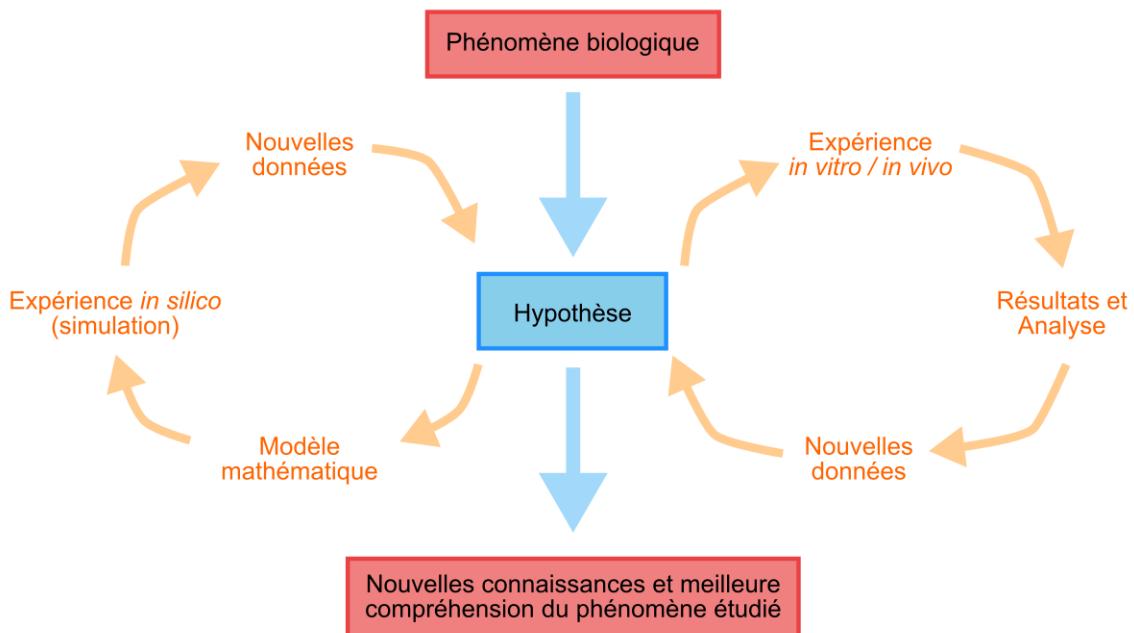


Figure 1.17: Schéma reproduisant un workflow expérimental possible lors de l'étude d'un phénomène biologique par une approche de modélisation (adapté de Woelke et al. (2010)).

Il peut apporter une vision plus précise du processus étudié, notamment en quantifiant différents paramètres et propriétés du système qui peuvent par la suite être comparés à des mesurables décrivant le processus *in vivo*.

La modélisation mathématique a pris son essor avec la modernisation des ordinateurs et du calcul numérique durant ces 20 dernières années. Cet outil, parfois complexe à appréhender et à comprendre, est la continuité naturelle des modèles mentaux que les scientifiques établissent par la déduction logique depuis toujours.

La mitose est un processus cellulaire d'une extrême complexité en grande partie due au grand nombre de phénomènes mis en jeu dans un volume si petit. Il en résulte qu'il est à ce jour, en 2015, encore hors de notre portée de modéliser avec précision la mitose dans son intégralité. Chaque modèle s'applique donc à décrire un moment bien spécifique de la mitose avec un niveau de précision plus ou moins important. Ces deux variables expliquent la grande diversité des modèles existants.

Pour finir on soulignera l'existence de nombreux modèles décrivant des phénomènes biologiques très spécifiques tels que l'instabilité dynamique des microtubules (Bowne-

Anderson et al., 2013; Nedelec and Foethke, 2007), la génération de force au niveau de l’attachement kinétochore-microtubule (Keener and Shtylla, 2014, Shtylla and Keener, 2011), l’effet de certaines kinésines sur la dynamique des microtubules (Hough et al., 2009; Reese et al., 2014). Ces modèles sortent du cadre d’une description générale du processus de la mitose et ne seront pas discutés ici.

1.4.2 Comment modéliser le mouvement des chromosomes ?

Tout système mécanique peut se modéliser en résolvant les équations des forces appliquées sur le système. Cette approche a été utilisée pour la première fois par Scholey et al. afin de modéliser le mouvement des chromosomes durant la mitose (Civelekoglu-Scholey et al., 2006). Par la suite, l’équipe de Sylvie Tournier a repris l’idée original du modèle de « force balance » afin d’étudier la ségrégation des chromosomes en supposant des attachements stochastiques entre les microtubules et les kinétochores (Gay et al., 2012).

1.4.2.1 Types de forces en jeux

Une force est une « influence » qui peut provoquer l’accélération d’une particule ou la déformation d’un objet contraint (Howard, 2001). Les forces peuvent avoir pour origines des processus physiques très divers. En voici une liste non exhaustive :

- les forces **magnétiques**, d’amplitude très faible au niveau moléculaire, sont provoquées par un champs magnétique qui s’applique sur des protons possédant un moment magnétique.
- un objet de masse m subit une force **gravitationnelle** de magnitude mg , où g est l’accélération causée par la gravité. Au niveau cellulaire cette force est très petite.
- une force **centrifuge** est subi par un objet en rotation. Sa magnitude vaut ma_c , où a_c correspond à l’accélération centrifuge. On peut aussi noter que la force centripète est la force opposée à la force centrifuge qui empêche un objet en rotation de « fuir » le centre.
- une force **optique** est une force de collision correspondant à une pression optique dû au moment cinétique des photons. Les photons peuvent donc exercer une force quand ils sont diffractés par un objet. Cette force est très faible dans la nature, par exemple si une molécule absorbe 10^9 photons par seconde (cela correspond à un laser puissant), la force optique ne sera que de $10^{-6}pN$.

- les forces **thermiques** sont un autre type de force de collision dues au choc sur un objet par une multitude d'objets de taille plus faible. Par exemple une protéine en suspension dans de l'eau va subir une force thermique à cause du choc des molécules d'eau à sa surface. L'ensemble des collisions provenant de toutes les directions, il en résulte une force totale net aléatoire. La force appliquée sur une protéine de $100kDa$ est de l'ordre de $500pN$. Cette force gouverne un processus physique appelé mouvement brownien ou encore marche aléatoire.
- les forces **électrostatiques** s'appliquent à une particule chargé q par un champ électrique E . Elle est de magnitude $F = qE$. Ces forces sont à l'origine du lien qui attache les différents atomes d'une molécule.

La nature très diverse de ces forces ainsi que la difficulté à les mesurer à des échelles microscopiques les rend difficilement utilisables pour l'étude des processus cellulaires et subcellulaires.

Afin d'étudier des systèmes mécaniques à des échelles cellulaires et subcellulaires on utilise trois éléments mécaniques fondamentaux qui sont le ressort, l'amortisseur et la masse. En effet, une protéine ou un élément subcellulaire peut être assimilé à un système mécanique composé d'atomes qui ont une masse, reliés par des liens qui possèdent une élasticité.

D'après la seconde loi de Newton, la masse provoque une accélération constante égale à $a = F/m$ où a est l'accélération, F la force appliquée et m la masse (Figure 1.18). Si on définit l'accélération a comme étant la dérivée première de la vitesse v et la dérivée seconde de la position x par rapport au temps t , on a :

$$F = ma = m \frac{dv}{dt} = m \frac{dx^2}{dt^2}$$

Un amortisseur est un élément mécanique qui répond à une force appliquée en se déformant à vitesse constante avec une magnitude de $v = F/\gamma$, où γ correspond au coefficient de viscosité (Figure 1.18). Cet objet idéal est utilisé pour modéliser le mouvement d'un objet dans un fluide comme par exemple une cuillère qu'on insère dans un pot de miel. L'action de tirer rapidement la cuillère hors du pot, peut soulever le pot à cause du coefficient de viscosité élevé du miel qui va contrer la force de la cuillère tirée de manière proportionnelle à la vitesse.

Enfin, un ressort est un élément mécanique qui résiste à la déformation par une force proportionnelle à l'amplitude de la déformation. L'allongement d'un ressort par rapport à sa longueur de repos est égale à $L = F/\kappa$, où κ la constante d'élasticité et L l'allongement

(Figure 1.18). Si la constante d'élasticité est indépendante de la force ou de l'extension, on dit que le ressort suit la loi de Hooke.

| Type d'élément mécanique | Schéma | Equation | Ordre de grandeur |
|--------------------------|--------|-----------------|-------------------|
| masse | | $F = ma$ | 10^{-9} pN |
| amortisseur | | $F = -\gamma v$ | 1-1000pN |
| ressort | | $F = -\kappa x$ | 1-100pN |

Figure 1.18: Schéma des trois éléments mécaniques fondamentaux : la masse, l'amortisseur et le ressort (adapté de Howard (2001)). Les ordres de grandeurs correspondent à la magnitude des forces rencontrées au niveau moléculaire : forces élastiques pour le ressort, forces visqueuses pour l'amortisseur et force gravitationnelles pour la masse.

Ces trois éléments mécaniques sont donc suffisant pour modéliser avec une bonne approximation un grand nombre de systèmes mécaniques complexes comme par exemple le fuseau mitotique. Pour cela on construit une géométrie en assemblant ces différents éléments en série ou en parallèle les uns par rapport aux autres. Puis on utilise l'équation du mouvement afin de calculer la dynamique du système.

1.4.2.2 L'équation du mouvement

Une fois le système mécanique décrit, on utilise l'équation du mouvement afin de suivre l'évolution de la position de chaque objet du système dans le temps, défini par :

$$\sum F - \gamma \frac{dx}{dt} - \kappa x = m \frac{d^2x}{dt^2}$$

Où le terme inertiel est la seconde loi de Newton, le terme dépendant de la vitesse $\frac{dx}{dt}$ correspond aux forces visqueuses et le troisième terme est du aux forces élastiques. $\sum F$ correspond à toutes les autres forces externes appliquées au système (Figure 1.19).

Il est possible d'approximer l'équation du mouvement en enlevant le terme inertiel lorsqu'on étudie des systèmes où la force inertuelle est négligeable par rapport aux forces visqueuses. Par exemple dans le cas d'un système évoluant dans un milieu très visqueux

Equation du mouvement (en milieu très visqueux)

$$\sum F - \gamma \frac{dx}{dt} - \kappa x = m \frac{dx^2}{dt^2}$$

force visqueuse force élastique terme inertiel

$$Re = \frac{\rho Lv}{\eta} \ll 1$$

force visqueuse force élastique

Figure 1.19: L'équation du mouvement décrit l'évolution spatial d'un objet au cours du temps sous l'action de plusieurs forces qui lui sont appliquées. Le terme inertiel peut être omis dans le cas d'un objet évoluant dans un système très visqueux pour des nombres de Reynolds très bas.

par rapport à sa masse comme dans une cellule. Ce rapport entre les deux forces est symbolisé par le nombre de Reynolds.

$$Re = \frac{\rho Lv}{\eta}$$

Où ρ est la densité du fluide, L la longueur caractéristique de l'objet, v sa vitesse et η sa viscosité. Quand $Re \ll 1$, cela signifie que les forces dues à la masse sont négligeables par rapport aux forces visqueuses, ce qui est le cas dans un système subcellulaire (Figure 1.19). Par exemple pour une protéine d'une taille de 6 nm dans de l'eau (dont la viscosité vaut $10^{-3} Pa.s$), le nombre de Reynolds vaut environ 0.05. Et celui d'une bactérie de 2 μm vaut approximativement 5×10^{-5} .

On peut donc approximer l'équation du mouvement comme suit :

$$\sum F = \gamma \frac{dx}{dt} + \kappa x$$

1.4.2.3 Application au fuseau mitotique

Dans le cas du fuseau mitotique, on identifie en premier lieu, l'ensemble des différents objets qui composent le fuseau tel que les pôles, les kinétochores, les sites d'attachement, etc. Ensuite on définit les propriétés visco-élastiques décrivant chacun des objets pour ensuite définir les forces appliquées sur le système. Par exemple la force due à un attachement élastique entre les deux kinétochores (qui correspond à la cohésine) va dépendre de la position relative des deux kinétochores l'un par rapport à l'autre et du paramètre de raideur κ qui caractérise la cohésine et qui peut être déterminé *in vivo* (Figure 1.20).

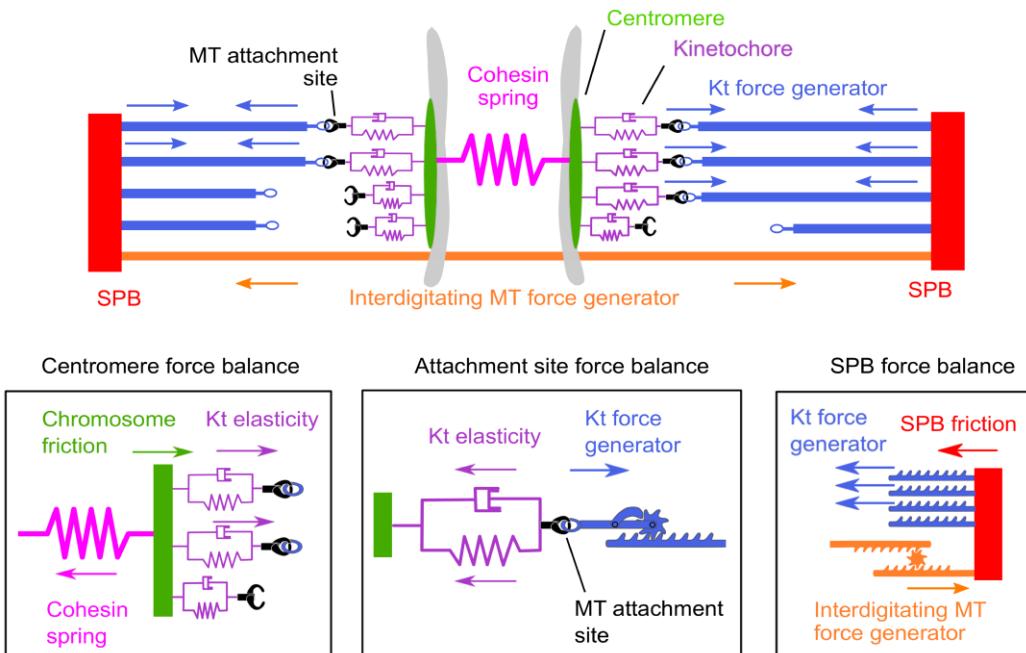


Figure 1.20: Le fuseau modélisé est composé de différents objets ayant des propriétés visco-élastique définies. On décrit aussi les forces appliquées sur les objets comme par exemple la force motrice qui tire sur un site d'attachement (en violet) quand un microtubule s'y attache (en bleu) (Gay et al., 2012)

L'équation du mouvement assume donc qu'en chaque point de l'espace la somme des forces appliquées au système est nulle (parce que l'inertie est négligeable) :

$$F - \gamma \frac{dx}{dt} - \kappa x = 0$$

Cette équation différentielle peut ensuite être résolue afin de déterminer la vitesse et donc la position de chaque objet dans le temps.

On peut alors construire un système d'équation linéaire décrivant le système mécanique du fuseau mitotique (voir Gay et al. (2012) pour le système d'équation complet). La résolution numérique permet alors d'accéder aux trajectoires des kinétochores et des pôles (Figure 1.21).

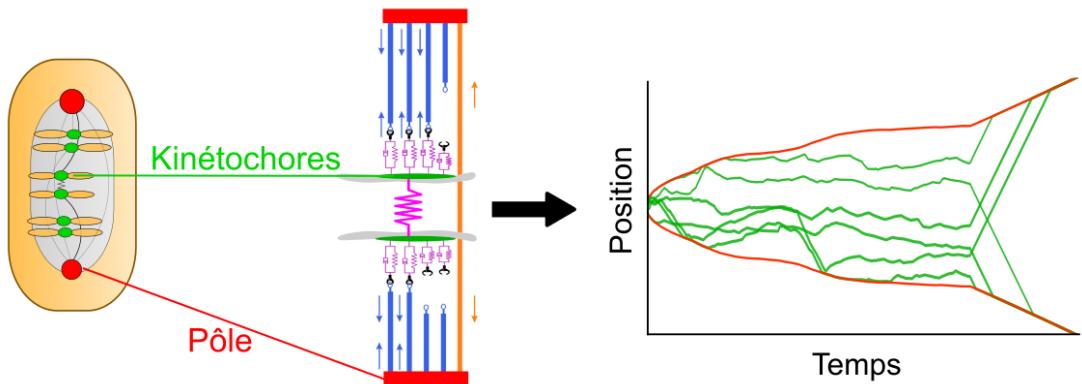


Figure 1.21: Une simulation numérique permet de résoudre l'équation du mouvement et ensuite accéder à l'évolution des positions de chaque objet au cours du temps. Les trajectoires à droite représentent les six kinétochores (vert) ainsi que les deux pôles du fuseau mitotique (rouge).

1.4.3 L’assemblage du fuseau mitotique

Durant l’assemblage du fuseau mitotique, le fuseau en cours de formation, « capture » les chromosomes par l’intermédiaire des microtubules (Nicklas and Ward, 1994). Ce processus de capture est étudié et modélisé depuis longtemps, ce qui en fait un bon exemple d’utilisation de la modélisation mathématique dans l’étude d’un processus biologique.

Le modèle le plus répandu décrivant l’assemblage du fuseau mitotique est celui appelé « recherche et capture » (Figure 1.22). Durant la prométaphase, les microtubules s’assemblent aux deux pôles du fuseau et vont « sonder » l’espace de manière stochastique afin d’attacher chacun des kinétochères. Des simulations numériques ont montré que ce processus seul n’est pas assez efficace pour expliquer les temps de prométaphase, rencontrés dans la plupart des organismes de l’ordre d’une dizaine de minutes (Wollman et al., 2005). Il existe donc des biais durant ce processus permettant une capture plus rapide et fidèle des chromosomes.

Un modèle propose que l’un de ces biais puisse être la présence d’un gradient de RanGTP autour des kinétochères (Figure 1.23). Une plus forte concentration de RanGTP stabiliseraient les microtubules et les feraient croître en direction des kinétochères (loin des pôles). Des simulations numériques ont montré que ce biais spatial lors du processus de recherche augmenterait la vitesse de capture des kinétochères (Wollman et al., 2005).

Cependant ce modèle encore trop naïf n’explique pas la précision avec laquelle le fuseau attache les chromosomes, en évitant les attachements syntéthiques et mérotélique. En effet des simulations de « recherche et capture » aléatoires ont montré la présence de 65% d’attachements mérotélique et seulement 15% d’attachements amphitélique (Paul et al., 2009).

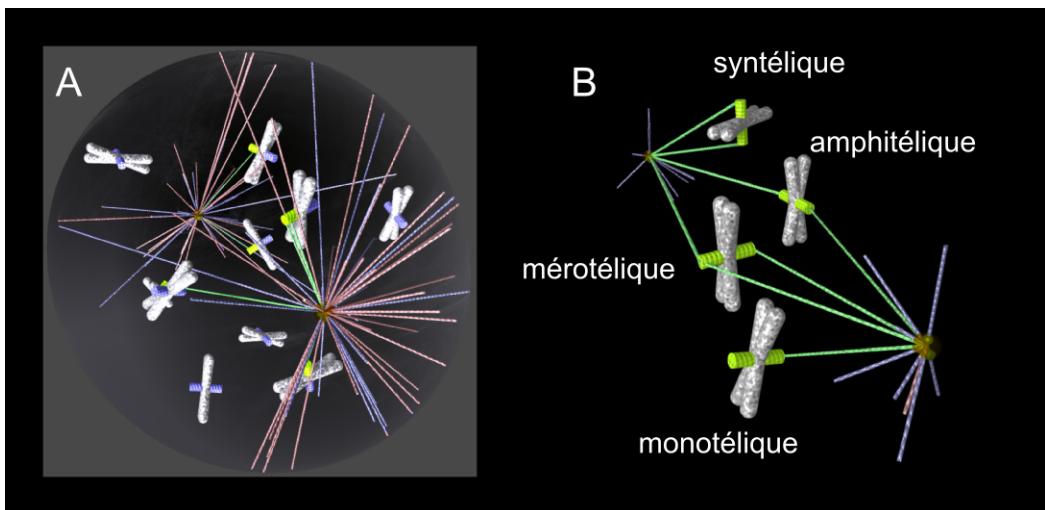


Figure 1.22: Modèle numérique de l’assemblage du fuseau (Paul et al., 2009). **A.** Des chromosomes durant la phase « recherche et capture ». Certains kinétochores sont attachés (en vert) et d’autres sont non attachés (en bleu). **B.** 4 types d’attachements possibles des chromosomes.

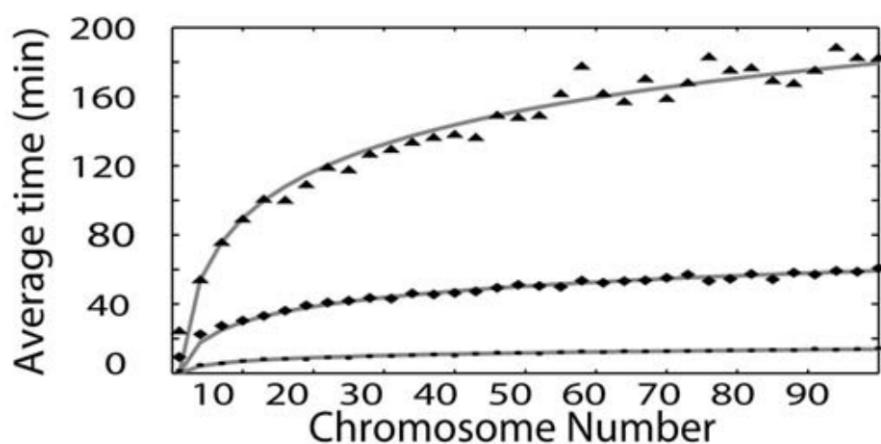


Figure 1.23: Temps moyen de capture de tous les chromosomes en fonction du nombre de chromosomes total pour trois modèles différents *in silico* : modèle non-biaisé (recherche aléatoire) avec 1000 MTs (triangles), modèle biaisé (gradient de RanGTP) avec 250 MTs (losanges), modèle biaisé avec 1000 MTs (cercles) (Wollman et al., 2005).

Deux mécanismes pourraient expliquer la précision des attachements *in vivo*. Le premier stipule que lors d'un attachement monotélique, le chromosome effectue une rotation de telle façon que le kinétochore attaché se positionne face à son pôle tandis que son kinétochore frère ferait face au pôle opposé et aurait donc une plus forte probabilité de s'y attacher (Figure 1.24A). Ce mécanisme réduit de manière importante le pourcentage d'erreurs quand il est inclus dans des simulations numériques (Mogilner and Craig, 2010; Paul et al., 2009).

Le second mécanisme serait que l'attachement amphitétrique apparaît de manière évolutive (un peu à la façon d'un processus Darwinien). C'est à dire que la capture serait un processus d'essais et d'erreurs itératif. Au début, les attachements syntétiques sont fréquents et disparaissent souvent (Lampson et al., 2004) jusqu'à ce que seuls les attachements amphitétriques soient conservés. Ceci est possible seulement si les taux d'attachement et de détachement dépendent de l'état d'attachement du kinétochore comme illustré Figure 1.24B. Ici aussi des simulations numériques ont montré que ce mécanisme réduit de manière très importante le nombre d'erreurs d'attachement (Mogilner and Craig, 2010; Paul et al., 2009).

Le mécanisme modulant les probabilités d'attachement en fonction de l'état du kinétochore pourrait impliquer une protéine telle que Aurora B comme déjà discuté en Section 1.2.6.

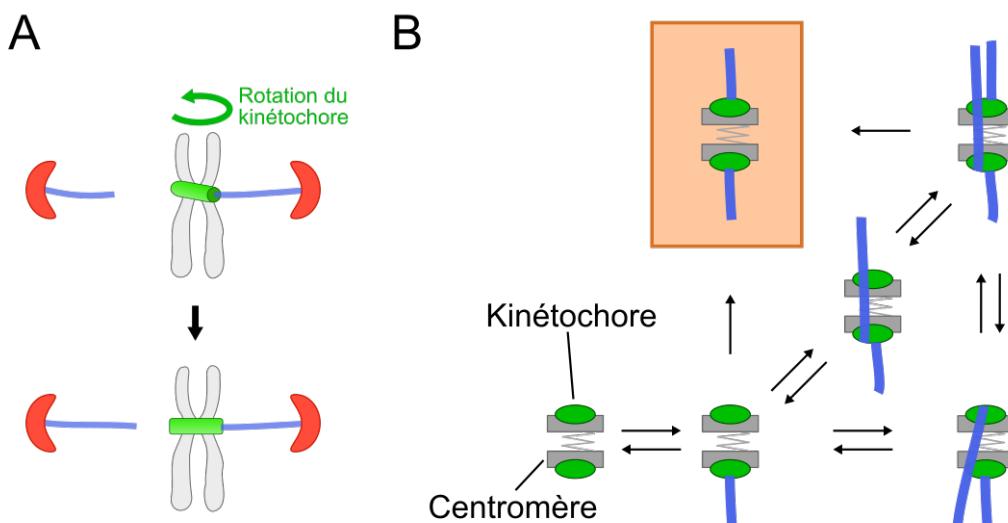


Figure 1.24: Deux mécanismes expliquant la fidélité des attachements durant le processus de « recherche et capture ». **A.** Mécanisme impliquant l'orientation du kinétochore frère en réponse à un attachement monotélique. **B.** Mécanisme évolutif qui « sélectionne » l'attachement amphitétrique (box couleur saumon) avec le temps en explorant différents états d'attachement.

1.4.4 La dynamique des chromosomes

La trajectoire des chromosomes en métaphase peut être reconstruite *in vivo* de manière très précise (Armond et al., 2015; Jaqaman et al., 2010; Ke et al., 2009; Wan et al., 2012), ce qui permet de comprendre les propriétés à la fois biochimiques et biophysiques gouvernant le mouvement, la position et l'attachement des chromosomes. Cependant les techniques d'acquisition par microscopie à fluorescence ne permettent pas pour le moment de résoudre l'état d'attachement ainsi que d'accéder aux différentes forces mise en jeu durant ce phénomène. La modélisation mathématique peut être une façon d'accéder à ces propriétés pour peu que le modèle en question puisse reproduire avec fidélité la trajectoire des chromosomes *in vivo*.

L'un des phénomènes qui reste encore largement mystérieux dans le mouvement des chromosomes durant la mitose est le mécanisme qui permet au kinétochore de maintenir son attachement à des microtubules qui dépolymérisent. L'un des premiers modèles expliquant ce phénomène est le modèle de Hill (Hill, 1985). Ce modèle (« Hill sleeve model » en anglais) utilise des propriétés classiques de cinétique et thermodynamique pour montrer comment un microtubule qui dépolymérise peut rester attaché profondément dans une région du kinétochore composée de « crans » qui sont autant de mini barrières d'énergie (Figure 1.25A). Les hétérodimères de tubuline interagissent avec un nombre fini de sites d'attachements le long de cette région du kinétochore avec une affinité modérée. L'insertion est donc contrôlée par les fluctuations thermiques et le microtubule peut perdre des sous-unités (dépolymérisation) aux endroits accessibles, c'est à dire dans la région la plus profonde du kinétochore. Le mouvement du microtubule est donc constraint et biaisé par différentes barrières d'énergie dues aux nombreux attachements du microtubule dans cette région du kinétochore.

Au début des années 2000, un modèle fondé sur l'idée du modèle de Hill et incluant une balance de force des différents composants du fuseau mitotique est proposé. Les auteurs ont généralisé le précédent modèle en prenant en compte les deux chromatides sœurs ainsi que plusieurs sites d'attachements par kinétochore (Joglekar and Hunt, 2002). Les sites d'attachements de chaque microtubule sont insérés au niveau de la plaque externe du kinétochore et sont modélisés comme un ressort suivant la loi de Hook (« Hookean spring » en anglais). Les forces de tensions entre les kinétochères frères dues à la cohésine sont aussi prises en compte.

Ces deux modèles supposent donc que le principal acteur qui dirige le mouvement des chromosomes est la dynamique des microtubules. Le modèle de Hill est un modèle théorique car les protéines composant la région « crantée » du kinétochore ne sont pas spécifiées.

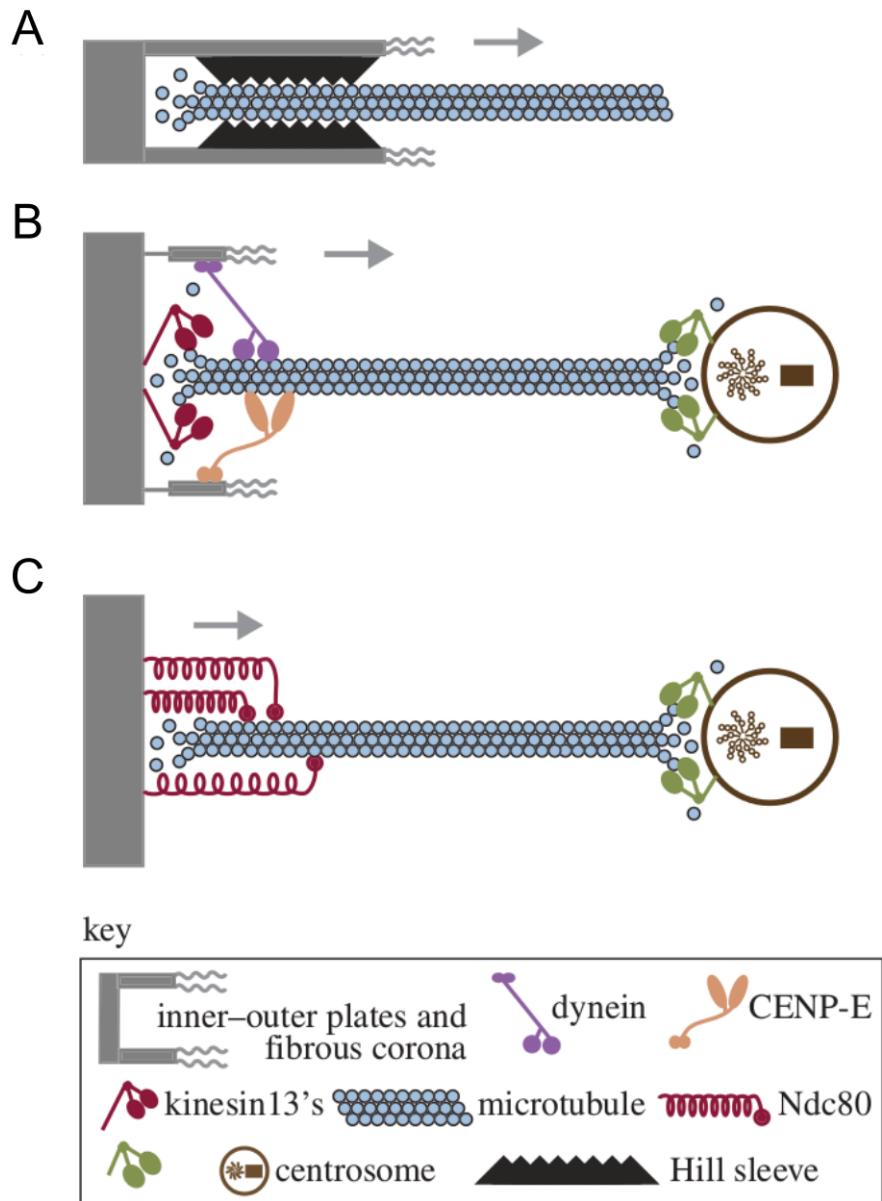


Figure 1.25: Différents modèles de types d'attachement entre le microtubule et le kinétochore (Civelekoglu-Scholey and Cimini, 2014). **A.** « Hill sleeve model » qui suppose l'existence d'un nombre fini de sites d'attachements arrangeés en série. **B.** Une balance de force est mise en place entre différentes protéines motrices localisées aux pôles du fuseau et au kinétochore. **C.** L'attachement se fait par un complexe protéique non moteur appelé NDC80. Il fait office de coupleur dynamique.

En 2006, une autre équipe proposa un modèle alternatif en se référant à des observations faites *in vivo* montrant que des protéines motrices étaient requises pour le mouvement des chromosomes dans un certain nombre d'organismes. Le modèle (Civelekoglu-Scholey et al., 2006) construit comme une balance de force est basé sur la présence des deux protéines motrices du kinétochore antagonistes, la dynéine et CENP-E, ainsi que deux membres de la famille des kinésine-13 localisés au niveau du pôle du fuseau et du kinétochore (Figure 1.25B). L'anaphase est aussi reproduite en dégradant le lien élastique entre les deux kinétochères représentant la cohésine. Ce modèle est capable de reproduire certaines propriétés du mouvement des chromosomes telles que leur vitesse de déplacement en métaphase et anaphase.

Cependant, le grand nombre de protéines incluses dans ce modèle a pour conséquence inévitable d'augmenter de manière importante le nombre de paramètres par rapport à d'autres modèles (Gay et al., 2012). Même si la majorité des paramètres proviennent de mesures faites *in vivo* et *in vitro* et sont donc fixes, certains sont basés sur des hypothèses fortes et il existe encore trop d'incertitude sur les propriétés biophysiques et les interactions possibles entre les différentes kinésines, la dynéine, le kinétochore et les microtubules pour qu'elles puissent être modélisées de manière fidèle et précise.

Par la suite, il fut proposé un nouveau modèle par Tournier et al. décrivant la correction des attachements mérotélique durant l'anaphase chez la levure à fission (Courtheoux et al., 2009). Ce modèle de balance de force est construit sur des observations microscopiques du fuseau et des kinétochères en anaphase. De plus il montre de manière élégante comment un phénomène purement physique (défaut d'équilibre des forces appliquées aux kinétochères) est capable de corriger un attachement mérotélique.

La même équipe proposa un peu plus tard un autre modèle plus général décrivant la dynamique du fuseau de la prophase et l'anaphase (Gay et al., 2012). Ce modèle est composé d'objets viscoélastiques représentant les composants du fuseau (pôle, kinétochore, cohésine et site d'attachement). Chacune de ces unités est arrangée de façon à former un fuseau (Figure 1.26). Les sites d'attachement sont autant de moteurs qui tirent le chromosome en direction du pôle quand il est actif. Les attachements se désactivent de manière stochastique, prenant également en compte deux mécanismes régulant l'attachement KT-MT: l'orientation du kinétochore et la tension exercée sur les deux kinétochères frères (Gay et al., 2012).

Ce modèle décrit la dynamique du fuseau à un niveau macroscopique plus haut que le modèle proposé par Civelekoglu-Scholey et al. L'une des forces du modèle est sa capacité à décrire la dynamique des attachements en métaphase et anaphase sans faire d'hypothèse forte sur le fonctionnement de l'attachement et des différentes protéines

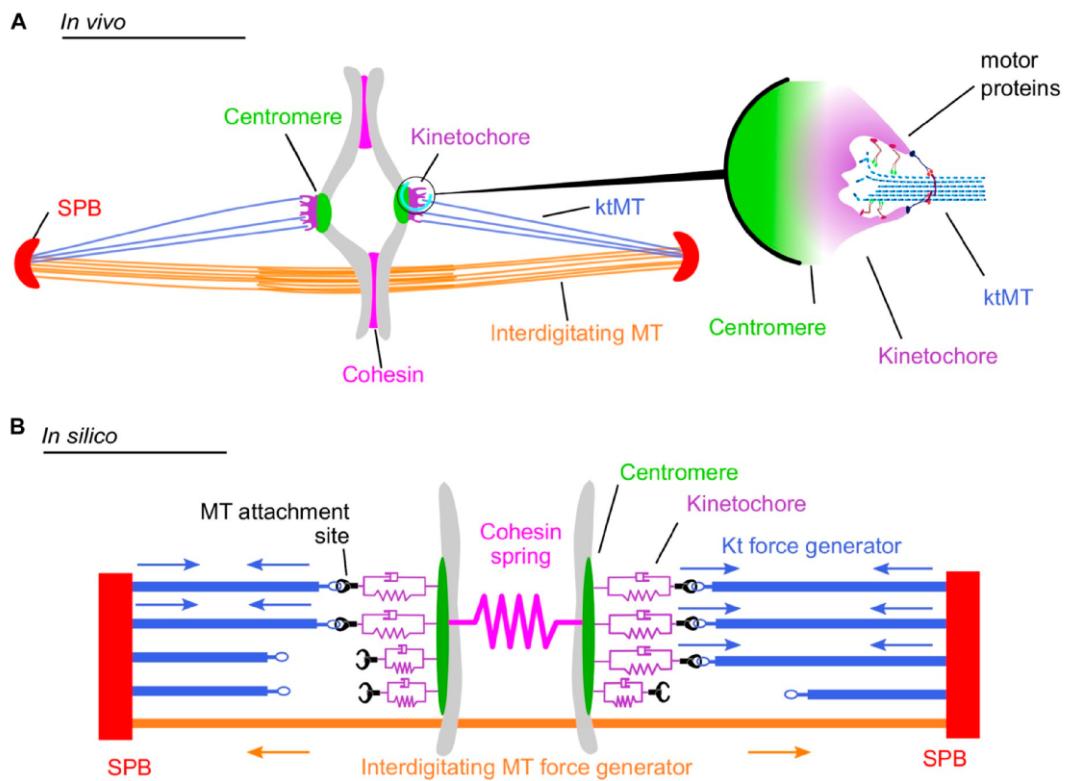


Figure 1.26: Modèle de ségrégation des chromosomes basé sur un attachement KT-MT stochastique (Gay et al., 2012). **A.** Schéma du fuseau mitotique de la levure à fission. **B.** Schéma du modèle représentant la façon dont sont agencés les différents éléments mécaniques du modèle reproduisant un fuseau mitotique *in vivo*.

participant à ce processus. Les paramètres qui le composent résultent d'un grand nombre de mesures *in vivo* qui décrivent non pas des propriétés individuelles de protéines mais des propriétés biophysiques d'objets macroscopiques composant le fuseau telles que les constantes d'élasticité du kinétochore ou d'un site d'attachement.

Un autre modèle de balance de force (Campàs and Sens, 2006) adopte une approche simplifiée pour décrire le mouvement des chromosomes monotélique. Le mouvement est principalement produit par des protéines motrices, les chromokinésines, qui par l'intermédiaire des microtubules vont exercer une force sur les bras des chromosomes, et ainsi générer une force dirigée dans la direction opposée à celle du pôle.

Plus récemment, un troisième mécanisme alternatif fut proposé pour expliquer l'attachement du microtubule au kinétochore. Ce modèle est une adaptation de celui de Civelekoglu-Scholey et al. (Figure 1.25C). Le mécanisme est basé sur des observations biophysiques d'un complexe protéique, appelé NDC80 et supposé être responsable de l'attachement entre le microtubule et le kinétochore (Alushin et al., 2010; Joglekar and DeLuca, 2009; Santaguida and Musacchio, 2009). En pratique ce modèle ressemble au modèle de Hill proposé par Joglekar & Hunt, à l'exception d'une différence très importante: les liens élastiques peuvent se détacher et s'attacher de manière indépendante les uns des autres (Figure 1.25C).

De plus, un mécanisme de « catch bond » est implémenté supposant qu'un lien se détache plus facilement sous une faible tension plutôt que sous une grande tension en agrément avec des mesures faites *in vitro* (Akiyoshi et al., 2010b). Il en résulte que les attachements avec un microtubule qui polymérise sont faibles tandis que les attachements contenant un microtubule qui dépolymérise sont forts.

La découverte d'une nouvelle structure responsable de l'attachement KT-MT (Miranda et al., 2005; Westermann et al., 2005), le complexe DAM1, a vu apparaître des nouveaux modèles de l'attachement proposant le complexe DAM1 comme coupleur principal entre le microtubule et le kinétochore (Efremov et al., 2007; McIntosh et al., 2008). Par exemple Efremov et al. ont montré que la structure en anneau de DAM1 permet un couplage efficace, qui peut fidèlement suivre un microtubule qui dépolymérise en captant l'énergie libérée par les protofilaments incurvés (Efremov et al., 2007). De plus cette association entre le kinétochore et le complexe DAM1 a aussi été observée *in vitro* par électro-microscopie (McIntosh et al., 2008).

Une équipe propose un modèle de la dynamique des chromosomes chez la levure à bourgeon (*Saccharomyces cerevisiae*) dans lequel chaque kinétochore ne peut contenir qu'un seul microtubule (Gardner et al., 2005, 2008). Le modèle mathématique prend en compte à la fois la régulation mécanique et moléculaire de la dynamique de l'extrémité

+ du microtubule attachée au kinétochore.

Il est bien entendu impossible de faire une liste exhaustive des modèles décrivant la dynamique du fuseau. Cependant on retrouve un point essentiel dans tout ces modèles : l'origine de l'énergie responsable du mouvement des chromosomes reste encore très hypothétique. Pour résumer, deux modèles existent : soit l'énergie provient de la dynamique du microtubule (modèle de Hill), soit l'énergie provient de protéines motrices (modèle de Civelekoglu-Scholey). On note qu'il est possible de modéliser la ségrégation des chromosomes sans aucune de ces deux hypothèses (Gay et al., 2012).

Pour une discussion plus détaillée sur les différents mécanismes capable de générer une force au niveau du kinétochore, voir le commentaire de Joglekar et al. (2010).

Dans un article (McIntosh, 2012), J. McIntosh souligne que ce problème de l'origine du mouvement des chromosomes est encore incertain et que la solution est probablement plus complexe qu'une origine unique pour tous les types de fuseaux et d'organismes existants. Il propose cependant dans une revue (McIntosh et al., 2010) que la dépolymérisation des microtubules pourrait être un ancien moteur biologique responsable du mouvement des chromosomes en soulignant deux choses. Chez certains organismes comme la levure à fission, la délétion de toutes les kinésines et dynéines, une par une, ne modifie pas la vitesse maximale des chromosomes en mitose. De plus, une protéine similaire à la tubuline existe chez la bactérie (appelé FtsZ) et contribue en grande partie à sa division (McIntosh et al., 2010).

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

La levure *Schizosaccharomyces pombe* (Figure 1.27) est une levure à division symétrique aussi appelée « levure à fission ». Elle est de forme cylindrique de 3 à 4 μm de diamètre et de 7 à 10 μm de longueur en fonction de l'étape du cycle cellulaire.

Elle se développe sur les racines des arbres ainsi que dans les sols à proximité. On la retrouve aussi dans les vieux alcools. La légende voudrait que la levure à fission ai été découverte dans un tonneau de bière périmée (*pombe* signifiant « dérivant de la bière »).

Depuis les années 50, les biologistes, sous l'impulsion de Urs Leupold ont établi la levure à fission comme un organisme modèle en isolant des mutants thermosensibles et en établissant les bases de la génétique moderne (Leupold, 1957).

Elle possède trois chromosomes et une phase haploïde dominante (avec une phase G2 très longue). La séquence de son génome a été publiée en 2002 par un consortium dirigé

par l’Institut Sanger. On estime que son génome contient environ 14 millions de paires de base codant pour ~5000 protéines et ~500 ARNs non-codant (Wood et al., 2002).

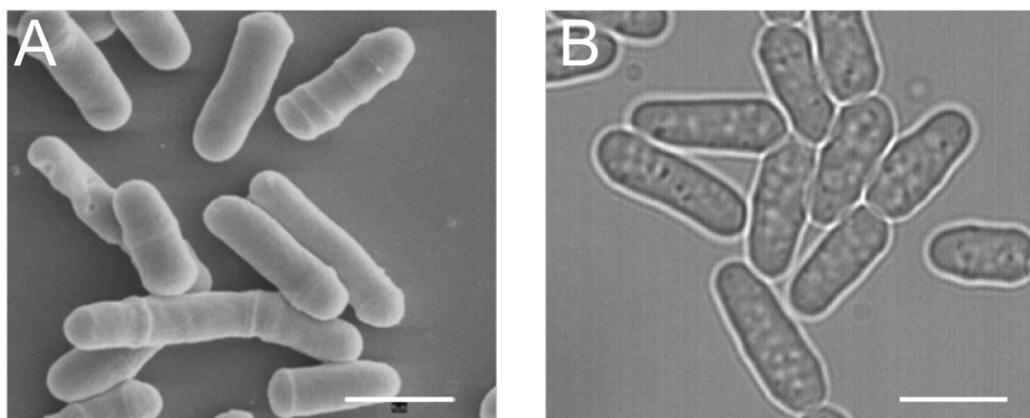


Figure 1.27: Morphologie de la levure à fission. **A.** Vue en microscopie électronique à balayage de *S. pombe* (Morgan, 2007). **B.** Vue en microscopie optique à champ large par lumière transmise. La barre correspond à 8 µm dans les deux vues.

Son cycle cellulaire classique est composé d’une phase G1 brève de 20 min suivi d’une phase S, d’une phase G2 longue de 2 h et d’une phase de division (la mitose) qui dure une vingtaine de minutes (Figure 1.28). En phase exponentielle de croissance, 80% des cellules sont en G2 et 15-20% en mitose.

Bien que les principaux mécanismes gouvernant la mitose soient conservés à la fois chez la levure à fission et chez les eucaryotes supérieurs, quelques différences existent. La levure ne possède pas de centrosome constituant les pôles du fuseau mitotique mais des structures appelées SPB (« Spindle Pole Body » en anglais). La mitose de la levure est fermée contrairement à de nombreuses cellules d’eucaryotes supérieurs, c’est à dire que la division s’effectue dans le noyau.

Les phases de la mitose sont classiques et composées de la sorte : la prométaphase qui dure 2.5 min, où le fuseau va s’allonger jusqu’à atteindre ~2.5 µm; la métaphase où le fuseau reste stable grâce à un mécanisme de balance de force, 2.5-3 µm; l’anaphase A dure moins de 20 s, l’allongement du fuseau est rapide, de l’ordre de 0.5 à 1 µm.min⁻¹ (Nabeshima and Nakagawa, 1998); enfin l’anaphase B qui dure ~10 min où le fuseau va s’allonger jusqu’à atteindre la taille de 5-6 µm avant l’initiation de la cytocinèse. La cytocinèse s’effectue par la contraction de l’anneau d’actine recruté au niveau du cortex de la cellule entre les pôles du fuseau mitotique.

Pour finir, la levure à fission est un puissant outil de génétique et de biologie moléculaire auquel il est aisément de supprimer ou de muter, de manière conditionnelle ou non, un gène ainsi que de marquer différentes protéines à l’aide de marqueurs fluorescents.

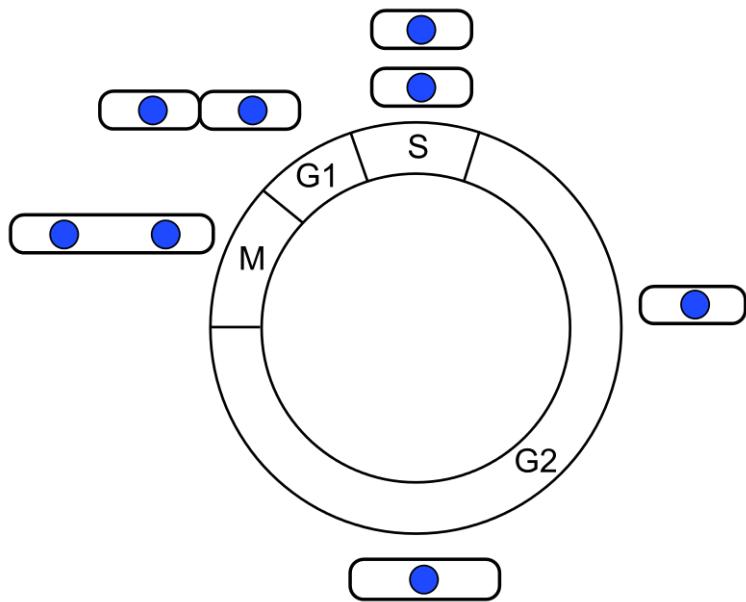


Figure 1.28: Schéma du cycle cellulaire de la levure à fission. La levure à fission possède une phase G2 très longue comparé à d'autres types cellulaires.

En 1996, une équipe a mis au point un système permettant la visualisation de la structure de la chromatine dans la levure à bourgeon et les cellules CHO (Robinett, 1996). Cette technique, appelée système LacO/LacI, consiste en l'insertion d'un grand nombre de répétitions (plusieurs centaines) de l'opéron *lac* (aussi appelée opéron lactose) au sein du génome. Le gène *lacI*, auquel a été ajoutée une sonde fluorescente GFP, code pour le répresseur qui va venir se fixer sur la partie du génome où a été inséré l'opéron *lac* (Figure 1.29A). Ce système a été appliqué par une autre équipe en 2003 afin de visualiser la partie péri-centromérique, proche du kinétochore (au alentour de 5 kb du centromère), du chromosome II de la levure à fission (Yamamoto and Hiraoka, 2003). Cette souche associée à un marqueur fluorescent des pôles du fuseau permet donc la visualisation et le suivi dans le temps de la position d'un chromosome au sein du fuseau mitotique (Figure 1.29B).

Schizosaccharomyces pombe est donc devenu une référence dans l'étude du cycle cellulaire. Cet organisme est très largement utilisé par de nombreux biologistes afin de mieux comprendre les mécanismes gouvernant et régulant la division cellulaire. Depuis quelques temps maintenant, la levure à fission devient aussi un modèle de choix dans l'étude des mécanismes biophysiques en jeu lors de la mitose.

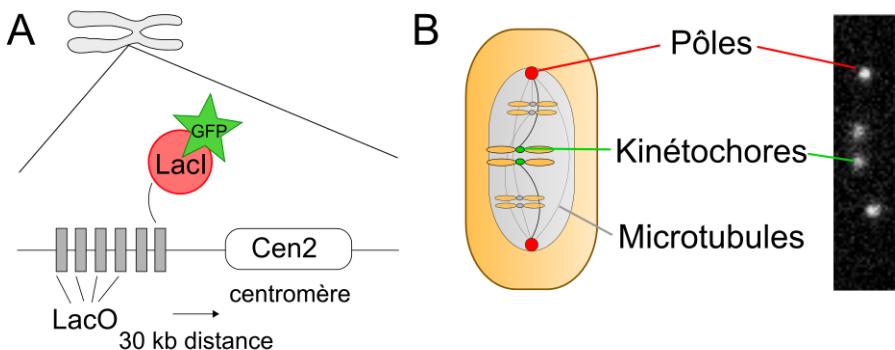


Figure 1.29: Visualisation d'un seul chromosome en microscopie à fluorescence. **A.** Système LacO/Lacl pour la visualisation d'une région spécifique d'un chromosome à l'aide d'un marqueur fluorescent de type GFP. **B.** Schéma et vue en microscopie à fluorescence d'une cellule de levure à fission marquée pour les deux pôles du fuseau et les deux kinétochores du chromosome II.

1.6 Problématique

L'approche biophysique dans l'étude de la mitose se justifie par le fait que ce processus implique le mouvement de grands objets à l'échelle de la cellule (les chromosomes) et donc l'existence de forces.

J'ai utilisé un ensemble de techniques provenant de différents domaines scientifiques (physique, biologie et informatique) afin d'appréhender la façon dont est régulée la dynamique des chromosomes durant la mitose.

Le terme « dynamique des chromosomes » est vaste et peut signifier beaucoup de choses. Ici on entend par « dynamique des chromosomes », l'ensemble des processus qui gouvernent l'évolution spatiale et structurelle des chromosomes tout au long de la mitose.

Plus précisément, ce travail a pour objectif d'étudier la régulation de la congression des chromosomes en fonction du mouvement des kinétochores durant la métaphase.

Pour cela, j'ai utilisé des souches de levures marquées pour les deux pôles du fuseau ainsi que les deux kinétochores du chromosome II. Les kinétochores sont ensuite observés en temps réel à l'aide d'un microscope à fluorescence à champ large, durant la mitose, afin de suivre, à différents intervalles de temps, leur position le long de l'axe du fuseau mitotique.

Des analyses informatiques combinées à des techniques d'imagerie ont ensuite permis d'extraire de manière automatique et reproductible la position des kinétochores afin de reconstruire leurs trajectoires au cours du temps. Les trajectoires ont ensuite été analysées par des techniques provenant de l'analyse du signal afin d'en extraire les principales propriétés.

Enfin un modèle mathématique de la mitose (Gay et al., 2012) a été utilisé afin de tester plusieurs hypothèses de mécanismes à l'origine de la congression ainsi que les mécanismes gouvernant le mouvement des chromosomes.

2

Résultats

2.1 « Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations »

Chez les eucaryotes supérieurs, la congression des chromosomes dépend entre autre de l'activité des chromokinésines. Cette étude analyse de manière quantitative l'oscillation et le positionnement des chromosomes dans la levure à fission (*S. pombe*), un organisme modèle qui ne possède pas de chromokinésine.

Dans des cellules sauvages, les chromosomes s'alignent durant la prophase et tout en oscillant maintiennent leur alignement jusqu'à la métaphase. L'oscillation des chromosomes n'est pas indispensable à l'alignement des chromosomes en métaphase.

Chez les eucaryotes supérieurs, la kinésine 8 contrôle la congression des chromosomes en régulant leurs oscillations. De manière opposée, nous montrons que la kinésine 8 de la levure à fission contrôle la congression des chromosomes par un mécanisme alternatif. Nous proposons que la kinésine 8 aligne les chromosomes en contrôlant les forces de traction en fonction de la longueur des microtubules attachés aux chromosomes.

De plus un modèle mathématique de la ségrégation des chromosomes implémentant ce mécanisme dépendant de la longueur est suffisant pour reproduire l'alignement des chromosomes et prévenir l'apparition de chromosomes retardataires en anaphase.

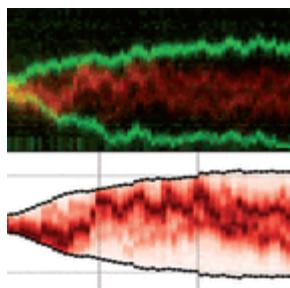
Dans l'ensemble, ces données illustrent comment l'action locale d'une protéine motrice

au kinétochore peut fournir une information spatiale à l'ensemble de fuseau afin de permettre l'alignement des chromosomes.

IN THIS ISSUE

Kinesin-8 in yeast chromosome congression

J Cell Sci 2015 128: e2005



Kinesin-8 family members have been shown to control chromosome congression in higher eukaryotes by regulating chromosome oscillations. However, it is unclear how kinesin-8-dependent regulation of microtubule (MT) dynamics contributes to chromosome alignment in *Schizosaccharomyces pombe*. On page 3720, Sylvie Tournier, Yannick Gachet and colleagues present a quantitative description of the oscillation and positioning of chromosomes in order to decipher the role of kinesin-8 in kinetochore alignment. They found that *ΔKlp6* cells, which lack kinesin-8 activity, have a defect in centering kinetochores. However, this defect was not caused by the increase of chromosome oscillation that the authors noted in these cells. Correcting the large drifts in kinetochore trajectories that resulted from unattached kinetochores in the absence of kinesin-8 did not rescue chromosome misalignment either. Insights into the molecular role of kinesin-8 came from the observation that kinesin-8 could control MT pulling forces in a length-dependent manner. By modelling spindle dynamics to predict chromosome segregation defects, the authors were able to demonstrate that including a length-dependent MT pulling force is sufficient to reproduce chromosome alignment. By contrast, omitting the pulling force contribution generated a situation resembling that in *ΔKlp6* mutant cells. Thus, in fission yeast, chromosome congression is achieved through a mechanism that involves the localised action of kinesin-8 at kinetochores to generate a force gradient to correctly align chromosomes.

© 2015. Published by The Company of Biologists Ltd

RESEARCH ARTICLE

Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations

Hadrien Mary^{1,2,*}, Jonathan Fouchard^{1,2,*}, Guillaume Gay³, Céline Reyes^{1,2}, Tiphaine Gauthier^{1,2}, Clémence Gruget^{1,2}, Jacques Pécréaux⁴, Sylvie Tournier^{1,2,†} and Yannick Gachet^{1,2,‡}

ABSTRACT

In higher eukaryotes, efficient chromosome congression relies, among other players, on the activity of chromokinesins. Here, we provide a quantitative analysis of kinetochore oscillations and positioning in *Schizosaccharomyces pombe*, a model organism lacking chromokinesins. In wild-type cells, chromosomes align during prophase and, while oscillating, maintain this alignment throughout metaphase. Chromosome oscillations are dispensable both for kinetochore congression and stable kinetochore alignment during metaphase. In higher eukaryotes, kinesin-8 family members control chromosome congression by regulating their oscillations. By contrast, here, we demonstrate that fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression by an alternative mechanism. We propose that kinesin-8 aligns chromosomes by controlling pulling forces in a length-dependent manner. A coarse-grained model of chromosome segregation implemented with a length-dependent process that controls the force at kinetochores is necessary and sufficient to mimic kinetochore alignment, and prevents the appearance of lagging chromosomes. Taken together, these data illustrate how the local action of a motor protein at kinetochores provides spatial cues within the spindle to align chromosomes and to prevent aneuploidy.

KEY WORDS: Fission yeast, Mitosis, Kinesin-8, Kinetochore alignment

INTRODUCTION

Chromosome congression is an evolutionary conserved feature of mitosis thought to promote faithful segregation of sister chromatids into daughter cells (Kops et al., 2010). In higher eukaryotes, efficient chromosome congression relies on multiple mechanisms and involves several microtubule (MT)-dependent motor proteins. On chromosome arms, the chromokinesins create the polar ejection forces (PEFs) that allow chromosome congression (Antonio et al., 2000; Funabiki and Murray, 2000; Rieder et al., 1986; Wandke et al., 2012). A second mechanism of congression involves CENP-E at kinetochores mediating the sliding of chromosomes along spindle MTs (Cai et al., 2009; Kapoor et al., 2006). In addition to

chromosome congression, bi-oriented sister kinetochores undergo oscillatory movements between the two spindle poles before chromosome segregation (Amaro et al., 2010; Pearson et al., 2001; Skibbens et al., 1993). Oscillations and congression of chromosomes are complex movements that require spatio-temporal control of tensional forces and attachment at the level of kinetochores that is far from being understood (Dumont and Mitchison, 2009). Multiple actors are involved in these processes, such as kinetochore components, non-kinetochore forces such as PEFs, motor proteins and MT-associated proteins, which control MT dynamics (Civelekoglu-Scholey et al., 2013; Joglekar et al., 2010; McIntosh, 2012). However, chromosome oscillations are not absolutely required for the execution of mitosis given that several cell types seem to successfully segregate chromosomes in the absence of oscillations (Desai et al., 1998; LaFountain et al., 2001).

Among the different players controlling kinetochore congression and oscillation, kinesin-8 family members are emerging as one of the most important motor proteins that participate in the correct distribution of forces within the spindle. Kinesin-8 is a highly processive motor known to regulate MT dynamics thanks to its plus-end-directed motility and plus-end-specific destabilizing activity (Gupta et al., 2006; Mayr et al., 2007). A combination of these two activities has been suggested to mediate an MT-length-dependent mechanism that is responsible for cellular MT-length homeostasis (Foethke et al., 2009; Tischer et al., 2009; Varga et al., 2006, 2009). Seminal works of West et al. and Garcia et al. have attested that Klp5 and Klp6, the fission yeast homologs of kinesin-8, are also required for normal chromosome movement and attachment (Garcia et al., 2002a; West et al., 2002). Interestingly, no chromokinesin homolog is present in fission yeast (Wood et al., 2002), so there are supposedly no anti-poleward ejection forces. There is also no poleward flux of tubulin within the spindle in this model system (Mallavarapu et al., 1999) as opposed to in higher eukaryotes (Mitchison, 1989). Thus, *Schizosaccharomyces pombe* has several features that make it a simple and attractive model to study the respective role of kinetochore components or MT dynamics in chromosome congression and oscillation. Mitosis in *S. pombe* consists of three phases (Nabeshima et al., 1998; Tatebe et al., 2001). During phase 1, a short (<2.0 μm) spindle is formed (prophase). In phase 2 (pro-metaphase, metaphase and anaphase A), the spindle maintains roughly the same length and the kinetochores make frequent, rapid movements between the poles. At the end of phase 2, sister chromatids separate and move towards the SPBs during anaphase A (Tournier et al., 2004). In phase 3 (anaphase B), the spindle elongates along the longitudinal axis of the cell.

To obtain a quantitative understanding of chromosome segregation, mathematical models of metaphase chromosome dynamics have been developed over the past few years (Civelekoglu-Scholey and Cimini, 2014; Vladimirov et al., 2011). Most of these models analyze how various components of a force-balance system affect chromosome oscillation, congression or segregation (Brust-Mascher et al., 2004;

¹Université de Toulouse, LBCMCP, 118 route de Narbonne, Toulouse F-31062, France. ²CNRS, LBCMCP-UMR5088, Toulouse F-31062, France. ³DAMCB, 43 rue Horace Berlin, Marseille 13005, France. ⁴IGDR, Institute of Genetics and Development of Rennes, University Rennes 1, Rennes F-35043, France.

*These authors contributed equally to this work

[†]Authors for correspondence (sylvie.tournier-gachet@univ-tlse3.fr; yannick.gachet@univ-tlse3.fr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 24 July 2014; Accepted 3 September 2015

Civelekoglu-Scholey et al., 2013, 2006; Courtheoux et al., 2009; Gay et al., 2012; Joglekar and Hunt, 2002; Paul et al., 2009). However, to date, there are no specific and quantitative descriptions of the mechanisms controlling fission yeast chromosome alignment or oscillation in mitosis or their role in kinetochore attachment.

Here, we present a quantitative analysis describing chromosome positioning and oscillation in wild-type fission yeast cells. Fission yeast chromosomes align during prophase and, while oscillating, remain aligned throughout metaphase. We demonstrate that chromosome oscillation is dispensable for kinetochore congression. Importantly, the role of kinesin-8 in chromosome congression is independent from its function in restricting chromosome oscillations to the spindle midzone. Finally, *in silico* and *in vivo* evidence suggest that a length-dependent process could participate in chromosome congression in fission yeast.

RESULTS

Kinesin-8 actively controls and maintains kinetochore alignment during mitosis

To explore the mechanisms controlling kinetochore alignment in *S. pombe*, we performed 3D live-cell imaging in wild-type and kinesin-8-deleted cells. We simultaneously imaged the pericentromere region of chromosome 2 (marked with Cen2–GFP) (Yamamoto and Hiraoka, 2003) and the spindle pole bodies (SPBs) (Cdc11–GFP) (Tournier et al., 2004) during mitosis. The observed trajectories confirmed that kinetochores of cells deleted for Klp6 were often found near the poles as opposed to kinetochores of wild-type cells, which were confined in the vicinity of the spindle center (Fig. 1A,B; Movie 1 and 2).

To characterize and quantitatively measure the chronology of kinetochore positioning from phase 2 (pro-metaphase and metaphase) to anaphase onset, we computed from multiple trajectories the average distance (d) between sister centromeres (red line) and the spindle center (purple line) as a function of time in parallel with spindle elongation (SPB position in black, Fig. 1C,D; see details in Materials and Methods and note that the graph is not normalized to spindle size). This measure provides an estimate of the mean gap between kinetochores and the spindle center throughout metaphase, whereas its standard deviation (pink zone) reveals the spreading of this measure. In both cell lines, the average gap between Cen2 signals (red) and the spindle pole (black) was unchanged throughout the metaphase process (starting from 1.5 μm spindles) until anaphase onset. Chromosome position was maintained throughout phase 2 suggesting that a stationary process controls kinetochore alignment during metaphase progression. In the absence of kinesin-8, kinetochores were constantly positioned further away from the spindle center and the large standard deviation suggests that they are widely spread over the entire spindle (Fig. 1B,D). Statistical analysis performed immediately before anaphase confirmed that sister kinetochores are found at an average distance from the spindle center of 0.113 ± 0.01 for wild-type cells ($n=52$) and 0.239 ± 0.01 for *klp6Δ* cells ($n=63$) (normalized distance relative to spindle size; Fig. 1E). Consistently with the heterodimeric association of Klp5 and Klp6, which is required for kinesin-8 function (Unsworth et al., 2008), both *klp5Δ* and *klp5Δ klp6Δ* double mutant showed the same deficiency in kinetochore centering (Fig. S1).

Given that kinesin-8-deleted cells exhibit larger spindles and a substantial metaphase delay as can be seen in Fig. 1B,F (Garcia et al., 2002b), we wondered whether these defects could indirectly be the cause of kinetochore mis-alignment. We tested the former hypothesis by increasing spindle size of both cell types using the temperature-sensitive cell cycle progression mutant *cdc25-22*. To

increase spindle size, we arrested *cdc25-22* and *cdc25-22 klp6Δ* cells at the restrictive temperature for 3 h (Fig. 1E,F; Fig. S1D). Increasing spindle size in the *cdc25-22* background had no effect on kinetochore alignment (Fig. 1E,F). Thus, the increased outward pushing forces developed at the spindle midzone when kinesin-8 is absent are not the cause of kinetochore mis-alignment.

Given that wild-type chromosomes were correctly aligned in metaphase, we hypothesized that kinetochore centering might occur earlier, possibly during prophase. We thus followed the position of the six kinetochores (marked by *ndc80-GFP*) according to the spindle poles (marked by *cdc11-CFP*) from phase 1 to the onset of phase 2 by tracking the maximum intensity of Ndc80 signals over time (Fig. 2A,B). The average position of kinetochores obtained from multiple Ndc80 trajectories was plotted according to time (Fig. 2C). In wild-type cells, at the onset of spindle pole separation (spindles under 0.5 μm), kinetochores progressively aligned to reach their relative metaphase position at a spindle size of 1.2 μm (time 4 min; Fig. 2A,C). By contrast, in kinesin-8-deleted cells, kinetochores remained randomly distributed during phase 1, phase 2 and the onset of anaphase (Fig. 2B,C).

To conclude, our results suggest that kinetochore centering in fission yeast takes place very early in mitosis, prior to metaphase, is maintained until anaphase onset and requires the function of kinesin-8.

Decreasing the amplitude of chromosome oscillation is not sufficient to correct kinesin-8-centering defects

Previous results obtained in higher eukaryotes have shown that the misalignment of kinetochores during metaphase correlates with larger and faster kinetochore movement in kinesin-8-deleted cells (Jaqaman et al., 2010; Stumpff et al., 2008). In order to accurately quantify chromosome movement in *S. pombe*, we imaged the centromeres of chromosome 2 (Cen2) and the spindle poles (Cdc11) at high frame rate (i.e. one image each 0.1 s) on limited segments of metaphase in wild-type and kinesin-8-deleted cells. Fig. 3A,B illustrates the typical trajectories obtained. To abolish kinetochore movement during metaphase, wild-type and kinesin-8-deleted cells were filmed in the presence of low doses of thiabendazole (TBZ; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a drug known to destabilize fission yeast interphase and spindle MTs when used at high doses (Umesono et al., 1983). In the presence of TBZ, the spindle size in phase 2 was similar to control conditions (Fig. S1C), suggesting that the global structure of the spindle is not affected by this treatment. However, an analysis of interphase MT dynamics in cells expressing *atb2-GFP* (tubulin–GFP) showed that the addition of TBZ reduces MT shrinkage rate and rescue frequency by a factor of two, whereas the growth rate and catastrophe frequency were not significantly affected by this treatment (Fig. S2).

To accurately quantify the variations in kinetochore movements, we determined the amplitudes and half-periods of oscillations in both cell types using Fourier analysis (Fig. 4A; Fig. S3; see Materials and Methods). The analysis revealed that the half-period ($T_{1/2}$) of these oscillations was not significantly different in the absence of kinesin-8 (Fig. 4B), whereas its corresponding amplitude was increased by a factor of ~ 1.5 (Fig. 4C). These results were confirmed using a second independent method to characterize the half-periods and amplitudes of chromosome oscillations (see Materials and Methods; Fig. S3). Both methods gave qualitatively similar results (Fig. S3D,E). Thus, kinesin-8 in fission yeast dampens chromosome motions by reducing their speed as observed in human HeLa cells (Jaqaman et al., 2010; Stumpff et al., 2008). Importantly, amplitudes and periods of oscillations were not significantly affected by increasing spindle size (Fig. S3F,G).

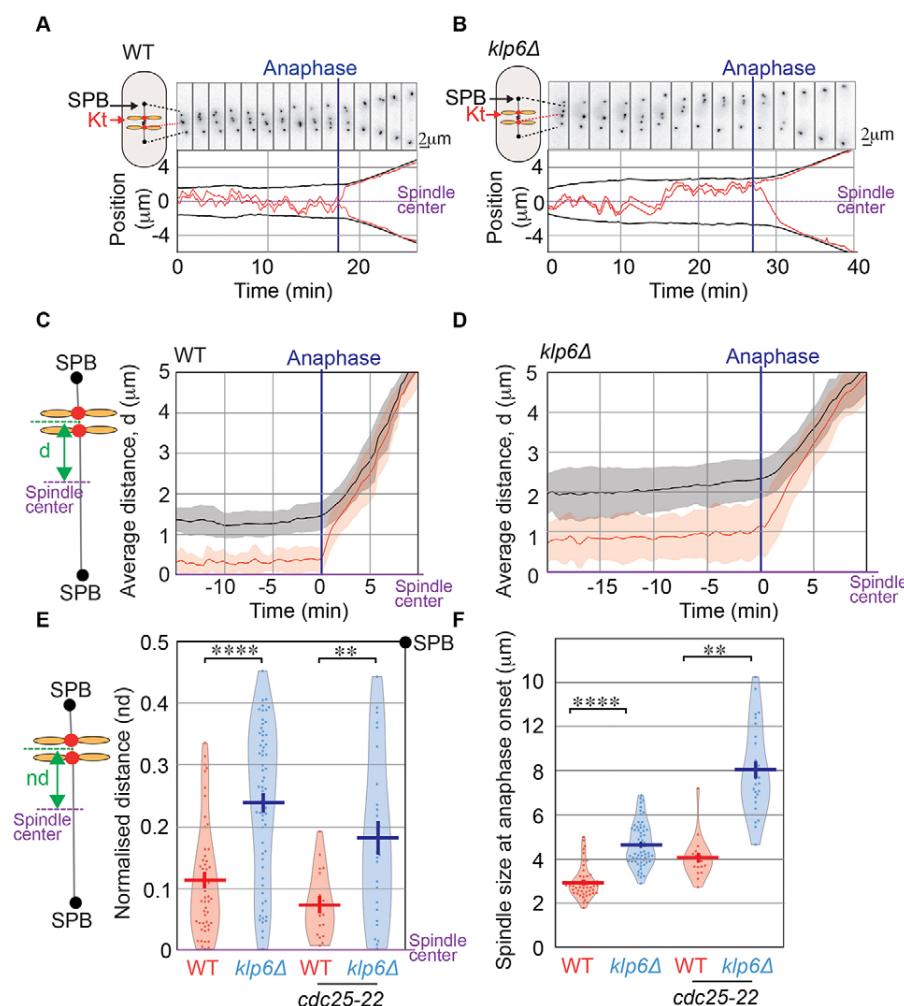


Fig. 1. The stability of sister kinetochore centering during metaphase depends on kinesin-8 activity. (A,B) Typical timelapse fluorescence images of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (marking the centromeric region of chromosome 2) and Cdc11-GFP (marking the spindle poles) during metaphase and anaphase. Frames were taken every 10 s. The lower panel is showing the corresponding trajectories of Cen2 (red) and SPBs (black) projected on a 1D axis whose origin is the spindle center. (C,D) Mean positioning of centromere 2 as a function of time from metaphase to anaphase. For each time-point, the absolute distance between Cen2 (red line) and the spindle center (purple line, 0 on the y-axis) or between the poles (black line) and the spindle center was computed and averaged from multiple movies (WT, $n=52$; *klp6Δ*, $n=63$) of mitotic cells. Pink and gray intervals indicate the s.d. (E) Global distribution of the normalized distances (nd) between Cen2 to the spindle center at anaphase onset in wild-type (0.11 ± 0.001 , $n=52$), *klp6Δ* (0.24 ± 0.001 , $n=63$), *cdc25-22* (0.007 ± 0.001 , $n=19$) and *cdc25-22 klp6Δ* (0.18 ± 0.003 , $n=26$) cells. Each distance between sister kinetochores to the spindle center is normalized according to spindle size so that sister kinetochore position varies between 0 (spindle center) to 0.5 (spindle poles). (F) Spindle size at anaphase onset in wild-type ($2.95 \pm 0.01 \mu\text{m}$, $n=52$), *klp6Δ* ($4.68 \pm 0.12 \mu\text{m}$, $n=63$), *cdc25-22* ($4 \pm 0.02 \mu\text{m}$, $n=19$) and *cdc25-22 klp6Δ* ($8 \pm 0.04 \mu\text{m}$, $n=26$) cells. The plots in E and F are violin plots, which combine a standard box plot with a density trace. Each circle represents a value in the dataset, the horizontal bar represents the mean of the distribution and the vertical bar represents s.e.m. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$ (Student's t-test).

To address whether the chromosome congression defects observed in kinesin-8-deleted cells result from an increase in the amplitude of oscillations, we analyzed chromosome movements in wild-type and kinesin-8-deleted cells in the presence of low doses of TBZ. The amplitude of chromosome movements was significantly reduced in both cell types as compared to control conditions (Fig. 4C), whereas the period of oscillations was unchanged (Fig. 4B). Thus, fission yeast kinetochore oscillations are largely powered by MT depolymerization. Interestingly, chromosome alignment in the presence of TBZ was slightly improved in both wild-type and mutant cells. However, abrogating oscillations was not sufficient to fully rescue the kinetochore alignment defects observed in kinesin-8-deleted cells (Fig. 4D).

Taken together, these observations demonstrate that an increase in MT-driven chromosome oscillation is not sufficient to explain chromosome congression defects of cells deleted for kinesin-8. Thus, an alternative mechanism controls chromosome congression in fission yeast independently of MT depolymerization and chromosome oscillation.

The presence of unattached kinetochores is not sufficient to explain the centering defects of kinesin-8 mutants

We hypothesized that imbalanced traction forces at kinetochores could lead to chromosome alignment defects by causing the appearance of drifts in kinetochore trajectories (Fig. 4A). Indeed, the analysis revealed the presence of large drifts in cells deleted for

kinesin-8 as shown in Fig. 5A, and measured in Fig. 5B. Given that previous studies have revealed that kinesin-8 is required for correct MT attachment (Garcia et al., 2002a), we reasoned that these large drifts in trajectories could be due to attachment defects. To test this hypothesis, we simultaneously analyzed kinetochore dynamics and the localization of the checkpoint protein Mad2 in a *cen2-GFP mad2-mCherry* strain deleted for Klp6. As previously described, in wild-type cells Mad2 localizes diffusely around the nuclear envelope during G2. As cells enter mitosis, Mad2 relocates to a region underlying the unseparated spindle poles that colocalizes with unattached kinetochores, remaining in this area as the spindle forms (Ikui et al., 2002). Once the spindle reaches a length of between 1 and 2 μm , Mad2 no longer colocalizes with the bi-oriented kinetochores (Courtheoux et al., 2007). In the Klp6 mutant, as opposed to wild-type, we observed bursts of Mad2 appearing on the kinetochore pair just prior to these large drifts, suggesting, in this case, that there was a total loss of chromosome attachment (an example of this phenomenon is shown in Fig. 5C). In agreement with this hypothesis, kinetochore speed during such crossing was similar to kinetochore speed at anaphase indicating that chromosomes must be detaching from one of the poles (Fig. 5D). Soon after the drifts, chromosomes rapidly reattached as judged by the disappearance of Mad2 and the reappearance of kinetochore oscillations (Fig. 5C).

Thus, kinetochore detachment might explain the increased amplitude of oscillations observed in kinesin-8-deleted cells.

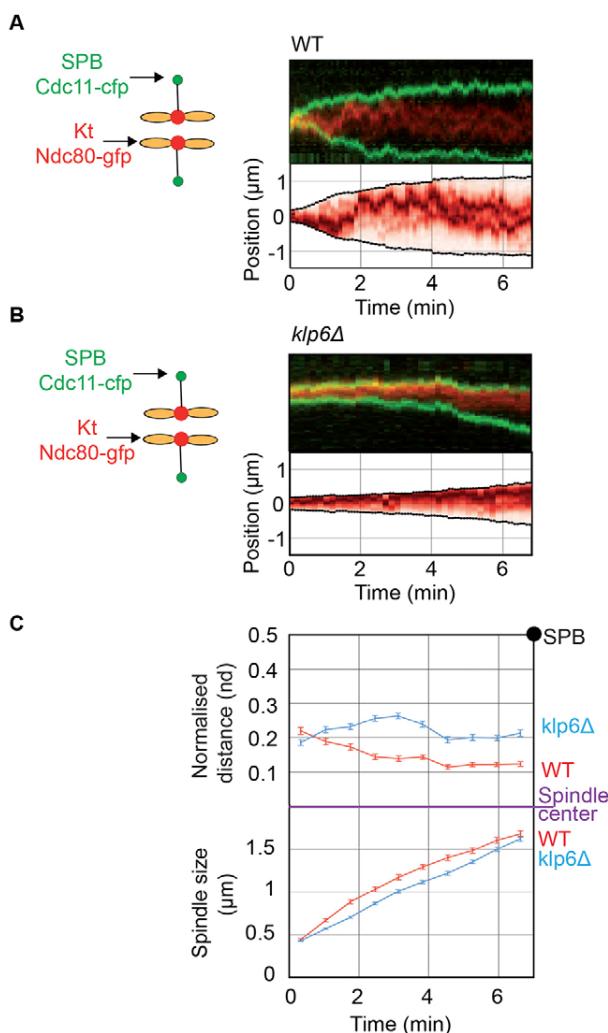


Fig. 2. Kinesin-8-dependent chromosome alignment is performed through an active process before metaphase. (A,B) Upper panel. Typical kymographs of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Ndc80-GFP (shown in red) and Cdc11-CFP (shown in green) from prophase to metaphase. Frames were taken every 5 s. The lower panel shows a computed kymograph where each time-point was normalized to the median intensity of the Ndc80 signal in the whole stack. (C) Upper panel; mean kinetochore distance to the spindle center normalized to spindle size (nd). The position of the maximum peak of intensity in the normalized kymographs (example in lower panel A and B) is used to identify the average position of the three chromosomes (assuming that they are close to each other in prophase). Data obtained from multiple kymographs of cells ($n=27$ for wild type; $n=34$ for *klp6Δ*) were used to plot the average position of kinetochores according to time. The time zero represents phase 1 onset; error bars are s.e.m. Note that the value of kinetochore positioning obtained at 4 min is very similar to that found in Fig. 1E. Lower panel; corresponding mean spindle size.

However, these drifts (as well as Mad2 bursts) were absent in the presence of low doses of TBZ (Fig. 5B). Given that the centering defects were still observed in the presence of TBZ in kinesin-8-deleted cells, our results suggest that the role of kinesin-8 in kinetochore centering is independent of stable kinetochore attachment.

Kinesin-8 accumulates at the plus-end of intra-nuclear spindle MTs in a length-dependent manner

In order to clarify the kinesin-8-dependent mechanism at the origin of kinetochore centering, we analyzed Klp5 movements on nuclear

MTs in mitosis. Although it is currently known that Klp5 translocates to the nucleus during mitosis (Unsworth et al., 2008), where it can be found at the kinetochores (Garcia et al., 2002b), the precise coordination between Klp5 movements and nuclear MT dynamics in mitosis has never been investigated. As it was not possible to visualize Klp5-GFP on individual MTs within the spindle, we instead recorded the progression of Klp5 along intra-nuclear MTs emanating from the spindle pole bodies in mitosis (Gachet et al., 2008) using a *klp5-GFP atb2-RFP* strain. During MT growth, Klp5-GFP patches rapidly moved on MTs to accumulate at the plus-end tips of intra-nuclear MTs. Then, the disappearance of Klp5-GFP patches correlated with the rapid depolymerization of MTs (Fig. 6A; Movie 3).

To quantify the accumulation of Klp5-GFP at the plus end of these MTs we performed high-frame rate acquisitions (Fig. 6B). We reported the intensity profile of Klp5-GFP along MTs for different MT length (see Materials and Methods for the normalization process). An accumulation of Klp5 was detectable at the plus-end tips of MTs in all cases, on either short (Fig. 6C, top panel) or long MTs (Fig. 6C, bottom panel). However, the maximum intensity of fluorescence at the plus end of intra-nuclear MTs increased with MT length (Fig. 6D), suggesting that kinesin-8 accumulates strongly on long MTs but less strongly on short ones during metaphase. Such behavior suggests that kinesin-8 could control traction forces at the kinetochore in a length-dependent manner, meaning that the longer is the MT, the higher its probability of catastrophe or its depolymerization rate. In agreement with this hypothesis, the length of intra-nuclear MTs was increased in cells deleted for kinesin-8 as opposed to wild type (data not shown).

Taken together, these observations suggest that kinesin-8 controls the size of MTs, and thus forces, through MT depolymerization, in a length-dependent manner.

A length-dependent control of pulling force is sufficient for kinetochore centering and prevents the appearance of lagging chromosomes

Our work suggests that kinesin-8 motors could act as regulators of force balance exerted on the bi-oriented chromosomes according to their position within the spindle. To test this hypothesis, we explored *in silico* the mechanisms of sister kinetochore centering during mitosis. We originally designed a force-balance model of mitosis that describes global spindle dynamics and predicts chromosome segregation defects (Gay et al., 2012). In this model, summarized in Fig. 7A,B, kinetochore pair breathing and oscillatory movements were modeled by a series of stochastic events of attachment and detachment at each MT attachment site, the pulling force being ‘on’ when a MT is attached and ‘off’ when it detaches. The overall pulling forces exerted on the outer side of the kinetochores are then balanced at their inner side by the cohesin retraction force. At the poles, an additional pushing force exerted on the interdigitated MTs tends to elongate the spindle and prevents its collapse (Courtheoux et al., 2009; Gay et al., 2012). In order to mimic the effect of Klp5 on the dynamics of kinetochores, we compared kinetochore centering in the absence (Fig. 7C) or presence (Fig. 7D) of a length-dependent pulling force by assuming the following hypothesis. If the catastrophe frequency or the depolymerization rate is higher for long kinetochore MTs than for short ones, then the force exerted on kinetochores attached to long MTs is on average higher than on short ones. Therefore, the modeled pulling forces on each attachment site were modulated by a spatial factor proportional to the distance between the kinetochore position and the spindle pole (see Materials and Methods and Table S1 for a description of model parameters). The value of this

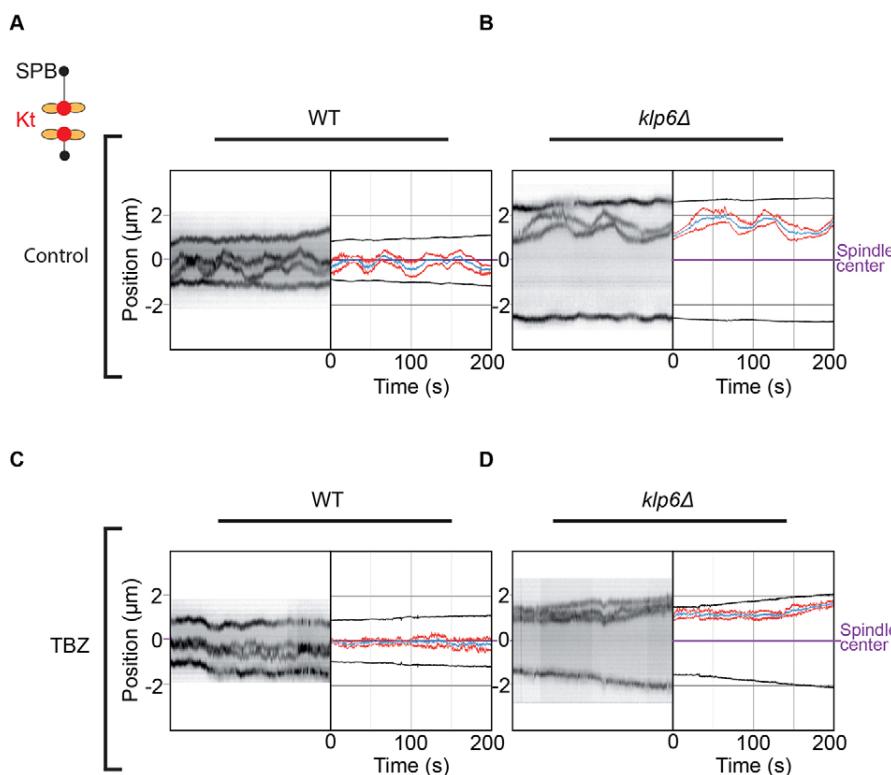


Fig. 3. Low doses of the MT-depolymerizing drug TBZ abolish chromosome oscillation but not centering. (A,B) Typical kymographs obtained at high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) and corresponding tracked trajectories of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (sister centromeres in red and their mid position in blue) and Cdc11-GFP (SPBs, black) during metaphase. (C,D) Typical kymographs obtained at high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) and corresponding tracked trajectories of wild-type or *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (sister centromeres in red and their mid position in blue) and Cdc11-GFP (SPBs, black) during metaphase, in the presence of 10 μ g/ml of TBZ.

factor was set to reflect the distribution of kinetochore positions at anaphase onset. Typical examples of simulated trajectories with the length-dependence pulling force turned on and off are shown in Fig. 7B,D. We observed that the length-dependent pulling force faithfully reproduced the positioning of kinetochores throughout metaphase, as observed *in vivo* (Fig. 7D). Quantitative analysis confirmed that the presence of this pulling force was sufficient to

reproduce kinetochore alignment in metaphase and prior to anaphase, whereas its removal mimicked the effect of kinesin-8-deletion (Fig. 7D,E). Previous work has shown that the number of lagging chromosomes at anaphase increases in *klp5Δ* cells, whereas the number of mis-segregations remained low (Sanchez-Perez et al., 2005). We used our model to evaluate the role of the centering mechanism in preventing chromosome segregation defects. As

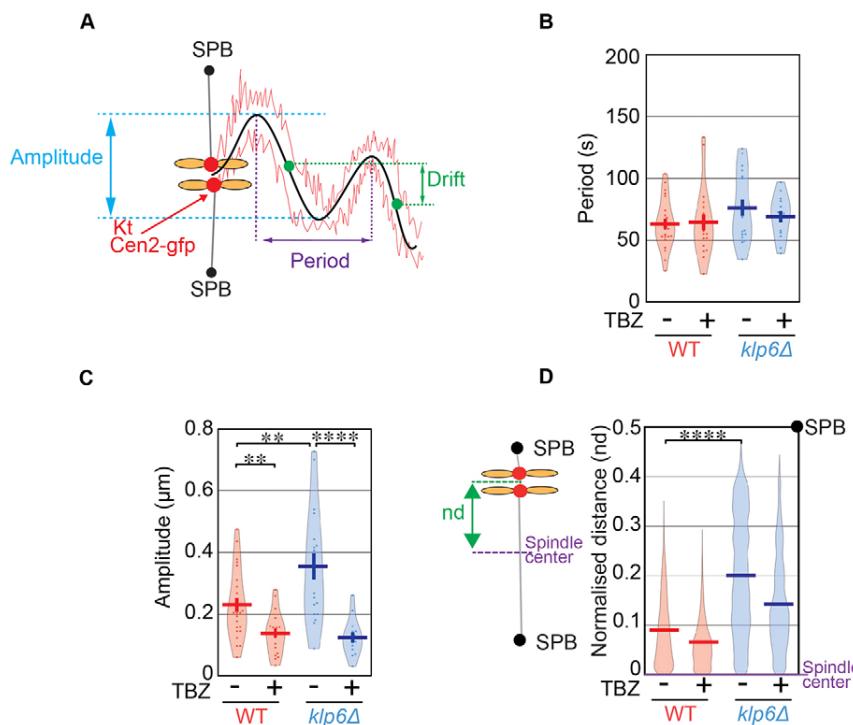


Fig. 4. Kinetochore oscillations are not required for the role of kinesin-8 in chromosome congression. (A) Schematic representation of oscillation periods, amplitudes and drifts in kinetochore trajectories. (B) Periods of kinetochore oscillations obtained with the Fourier transform method during metaphase in wild-type (WT) (control, 63 ± 4 s, $n=24$; TBZ, 64 ± 6 s, $n=19$) and *klp6Δ* (control, 76 ± 6 s, $n=18$; TBZ, 69 ± 5 s, $n=14$) cells in the presence or absence of 10 μ g/ml of TBZ. (C) Amplitude of kinetochore oscillations obtained with the Fourier transform method during metaphase in wild-type (control, 0.23 ± 0.02 μ m, $n=24$; TBZ, 0.14 ± 0.015 μ m, $n=18$) and *klp6Δ* (control, 0.35 ± 0.04 μ m, $n=19$; TBZ, 0.13 ± 0.02 μ m, $n=14$) cells in the presence or absence of 10 μ g/ml of TBZ. (D) Global distribution of the normalized distances (nd) between Cen2 to the spindle center for each high-frame-rate time-point during metaphase in wild-type (control, 0.09 ± 0.0002 , $n=73$, 460; TBZ, 0.06 ± 0.0002 , $n=63$, 390) and *klp6Δ* (control, 0.2 ± 0.0004 , $n=89$, 101; TBZ, 0.14 ± 0.0004 , $n=59$, 997) cells. Each distance between sister kinetochores to the spindle center is normalized according to spindle size so that sister kinetochore position varies between 0 (spindle center) to 0.5 (spindle poles). The plots in B–D are violin plots, which combine a standard box plot with a density trace. Each circle represents a value in the dataset, the horizontal bar represents the mean of the distribution and the vertical bar represents s.e.m. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (Student's *t*-test).

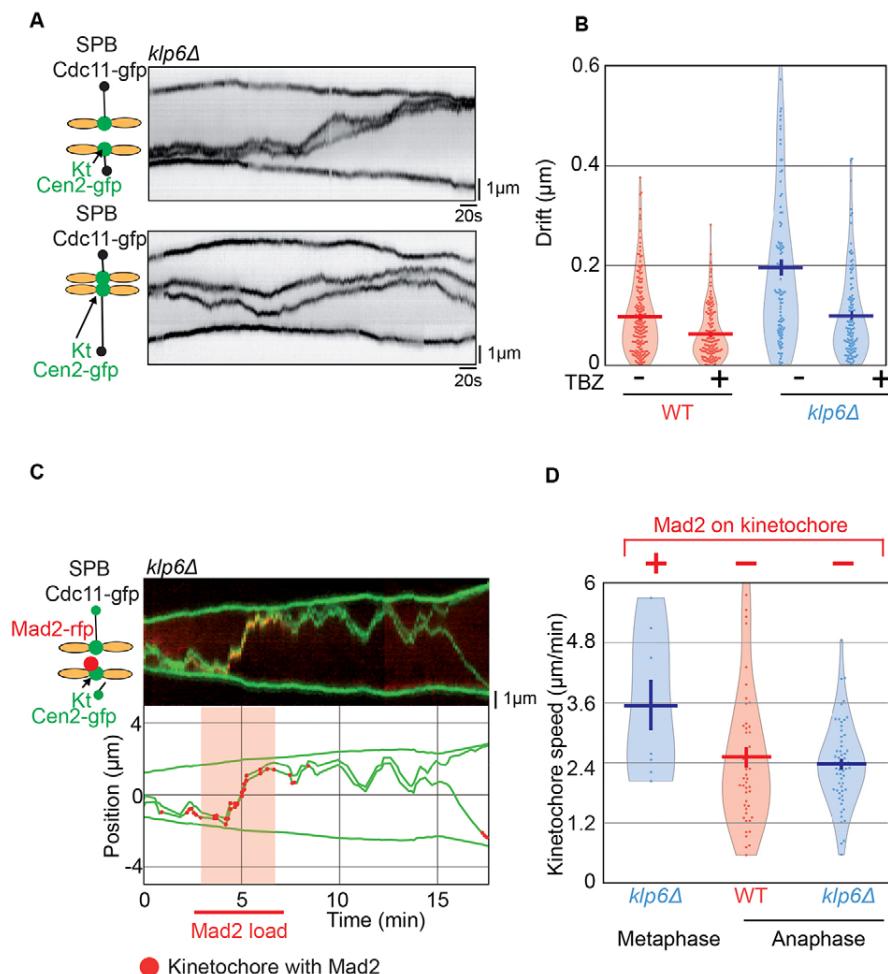


Fig. 5. Kinesin-8 mutants display imbalanced traction forces at kinetochores leading to chromosome detachment and instability in kinetochore positioning. (A) Typical kymographs obtained at a high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) of *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (to mark sister centromeres) and Cdc11-GFP (to mark SPBs) during metaphase. Note the instability of kinetochore positioning in metaphase (also called drift; Fig. 4A). (B) Determination of drift amplitudes between each oscillation event during metaphase in wild-type (WT) (control, $0.1 \pm 0.006 \mu\text{m}$, $n=171$; TBZ, $0.06 \pm 0.004 \mu\text{m}$, $n=141$) and *klp6Δ* (control, $0.2 \pm 0.02 \mu\text{m}$, $n=104$; TBZ, $0.1 \pm 0.008 \mu\text{m}$, $n=114$) cells in the presence or absence of 10 µg/ml TBZ. (C) Typical kymograph obtained at high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) and corresponding trajectories of *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (to mark sister centromeres, green), Cdc11-GFP (to mark SPBs, green) and Mad2-mCherry (to mark spindle checkpoint protein, red) during metaphase. The red circles on kinetochore trajectory and the red area illustrate the detection of Mad2-mCherry during the burst. (D) Determination of the maximum kinetochore speed at anaphase A in wild-type and *klp6Δ* cells as compared to the maximum kinetochore speed during a detachment event (as judged by the Mad2 burst) in *klp6Δ* cells in metaphase. The plots in B and D are violin plots, which combine a standard box plot with a density trace. Each circle represents a value in the dataset, the horizontal bar represents the mean of the distribution and the vertical bar represents s.e.m.

expected, *in vivo*, we found that the delay between the arrivals of the two sister chromatids at their respective pole was on average increased in kinesin-8 mutant compared to WT (Fig. 7F). The values obtained were comparable to *in silico* data when the length dependence was turned on or off (Fig. 7F). However, our model predicts that the rate of chromosome mis-segregation (two Cen2 signals at the same pole) is very low in both conditions, which is consistent with what has been reported *in vivo* (Sanchez-Perez et al., 2005; data not shown). Importantly, we modified other model parameters (including kinetochore attachment and detachment parameters, and force and velocity characteristics of pulling motors or cohesin stiffness) to evaluate their influence on chromosome alignment (Fig. 8A). Interestingly, only the addition of the length-dependent process substantially increased kinetochore centering during metaphase (Fig. 8A) without introducing aberrant mitotic phenotypes in simulations (Fig. 8B).

Taken together, our results suggest that a length-dependent pulling force is necessary and sufficient to align chromosomes and to prevent the appearance of lagging kinetochores. Our observations also imply that lagging chromosomes in kinesin-8 mutants are not caused by defective kinetochore attachment but rather due to kinetochore mis-alignment at anaphase onset.

DISCUSSION

Our study reveals the basic mechanisms required to align chromosomes in fission yeast. Chromosome alignment before anaphase onset relies on two discrete steps. First, during phase 1 (prophase), kinetochores congress

between the two spindle poles through an active mechanism. Second, during phase 2 (pro-metaphase and metaphase), kinetochores maintain this alignment at the spindle midzone while oscillating. Kinetochore oscillatory movements have been previously characterized in mammalian cells (Gardner et al., 2005; Jaqaman et al., 2010; Stumpff et al., 2008; Vladimirov et al., 2013) and in budding yeast (Pearson et al., 2001), but their role in chromosome alignment is unclear. Our work reveals that chromosome oscillations (i.e. triggered by MT depolymerization) is dispensable for chromosome centering because the suppression of oscillations with low doses of TBZ had no impact on kinetochore alignment throughout metaphase. In fission yeast, it is likely that kinetochore oscillations are mainly triggered by MT depolymerization. In agreement with this finding, the speed of kinetochores moving poleward (MT depolymerizing) is largely reduced in the presence of low doses of TBZ whereas the speed of kinetochores moving in an anti-poleward manner (polymerizing MTs) is barely unchanged (data not shown).

Kinesin-8 is emerging as one of the most important motor proteins that participate in the correct distribution of forces within the spindle. In fission yeast, kinesin-8 is required not only in phase 1 for chromosome congression but also in phase 2 to maintain stable kinetochore positioning. We favor a model where kinesin-8 controls the establishment of kinetochore centering (and thus controls the force balance at the kinetochore) to prevent kinetochore detachment at the spindle poles. In agreement with this hypothesis, we observed that kinetochore detachment generally occurs when chromosomes are located near the spindle poles (data not shown). The accumulation of kinesin-8

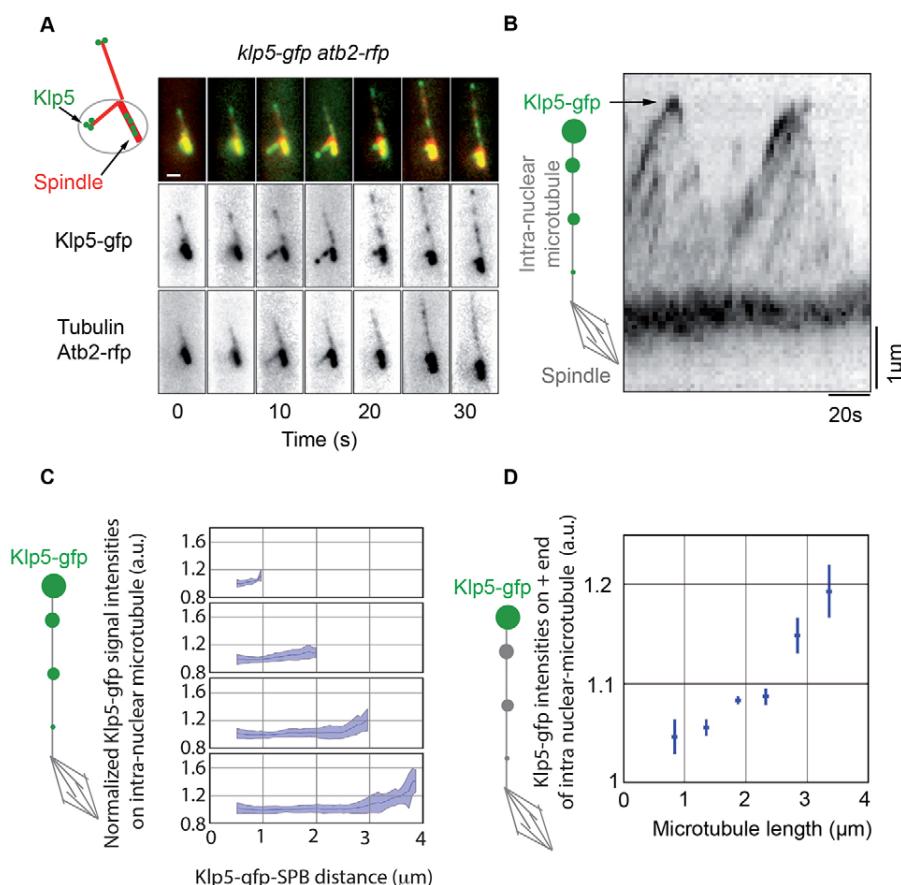


Fig. 6. Kinesin-8 accumulates at the tip of mitotic MTs in a length-dependent manner. (A) Typical time-lapse fluorescence images of wild-type cells expressing Atb2-GFP (tubulin) and Klp5-GFP (frames were taken every 5 s). Scale bar: 1 μm. (B) Kymograph representation of Klp5-GFP localization on intra-nuclear MTs (note the accumulation at the plus end). Cells were blocked in G2 at the restrictive temperature, released into mitosis at 25°C and the Klp5-GFP signal was captured at a high frame rate (frames were taken every 2 s). (C) Klp5-GFP signal intensity is shown according to its position along mitotic MTs for several sizes of MT. Multiple frames were used for each respective plot and originate from 37 individual cells (from top panel to bottom panel; 0.5 to 1 μm, n=29; 1 to 2 μm, n=240; 2 to 3 μm, n=154; 3 to 4 μm, n=81). Blue lines indicate mean values and cyan shading represents standard deviations. (D) Normalized Klp5-GFP intensities at the plus end of MTs as a function of intra-nuclear MT length (0.5 to 1.0 μm, n=29; 1.0 to 1.5 μm, n=94; 1.5 to 2.0 μm, n=146; 2.0 to 2.5 μm, n=90; 2.5 to 3.0 μm, n=64; 3.0 to 3.5 μm, n=59). The blue bars indicate s.e.m.

at the plus-ends of MTs and its function in controlling the size of intra-nuclear MTs might be reminiscent of what has been reported *in vivo* in interphase fission yeast cells (Tischer et al., 2009) and *in vitro* for the budding yeast kinesin-8 homolog, Kip3p or the human homolog Kif18A (Mayr et al., 2007). The role of length-dependent forces in kinetochore centering might be analogous to length-dependent pulling forces required for spindle centering in vertebrates (Mitchison et al., 2012; Wühr et al., 2009), except that kinesin-8 would play a role as a centering agent able to measure MT length in order to place the kinetochore at the spindle center.

Our study also reveals that an increase in MT-driven chromosome oscillation is not sufficient to explain the centering defects of kinesin-8 mutants given that abolishing chromosome oscillation does not restore alignment. It is thus tempting to speculate that the early stage of congression in fission yeast is reminiscent of the role of kinesin-7 (CENP-E) in the sliding of chromosomes along spindle MTs (Cai et al., 2009; Kapoor et al., 2006). Accordingly, *in vitro* studies suggest that *S. pombe* kinesin-8 might have plus-end-directed motor activities and share some properties with the kinesin-7 family (Grissom et al., 2009).

The role of kinesin-8 in kinetochore positioning can be mathematically reproduced by adapting the pulling force applied at kinetochores according to its position within the spindle. Indeed, a non-uniform pulling force is sufficient to align and maintain kinetochore alignment throughout metaphase. Similarly, modeling a non-uniform distribution of MT plus ends across the spindle is also sufficient to align chromosomes (data not shown), but further work would be necessary to discriminate between these two hypotheses. By contrast, increasing or decreasing other model

parameters such as the kinetochore attachment or detachment rate (i.e. frequency of kinetochore movements) is not sufficient for chromosome centering. Our model makes no hypothesis on the nature of the molecular motor involved in this centering mechanism or the origin of this length-dependence mechanism. However, *in vivo* accumulation of kinesin-8 during mitosis according to MT length is consistent with a modulation of the frequency rate of catastrophe (Gardner et al., 2008; Tischer et al., 2009; Varga et al., 2009) and as observed by electron microscopy, the size of MTs in the spindle is not uniform (Ding et al., 1993). Our model is not considering that chromosome alignment might also be influenced by correlated movements of non-sister kinetochores as recently described in human cells (Vladimirou et al., 2013). However, the spatial organization of chromosomes might be important for chromosome congression (Kitajima et al., 2011; Magidson et al., 2011), especially considering that physical links exist between telomeres of chromosomes in mitosis (Reyes et al., 2015).

Either way, our work demonstrates that a gradient of force is sufficient to align chromosomes, to maintain this alignment and to prevent the appearance of lagging chromosomes at anaphase onset. Given that the biological function for chromosome movements in mitosis remains elusive, our study provides the basis to understand this important question.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Media, growth, maintenance of strains and genetic methods were as previously reported (Moreno et al., 1991). Cells were grown at 25°C in yeast extract before mounting on an imaging chamber. The strains used in this study are listed in Table S2.

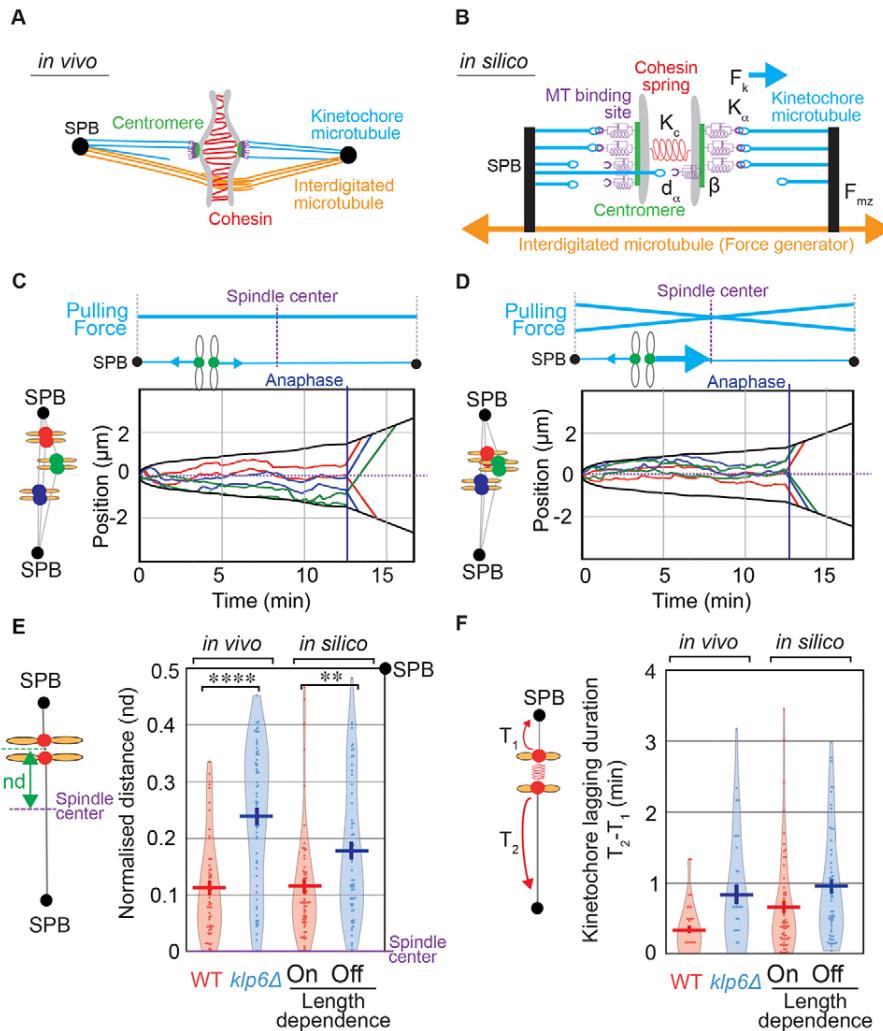


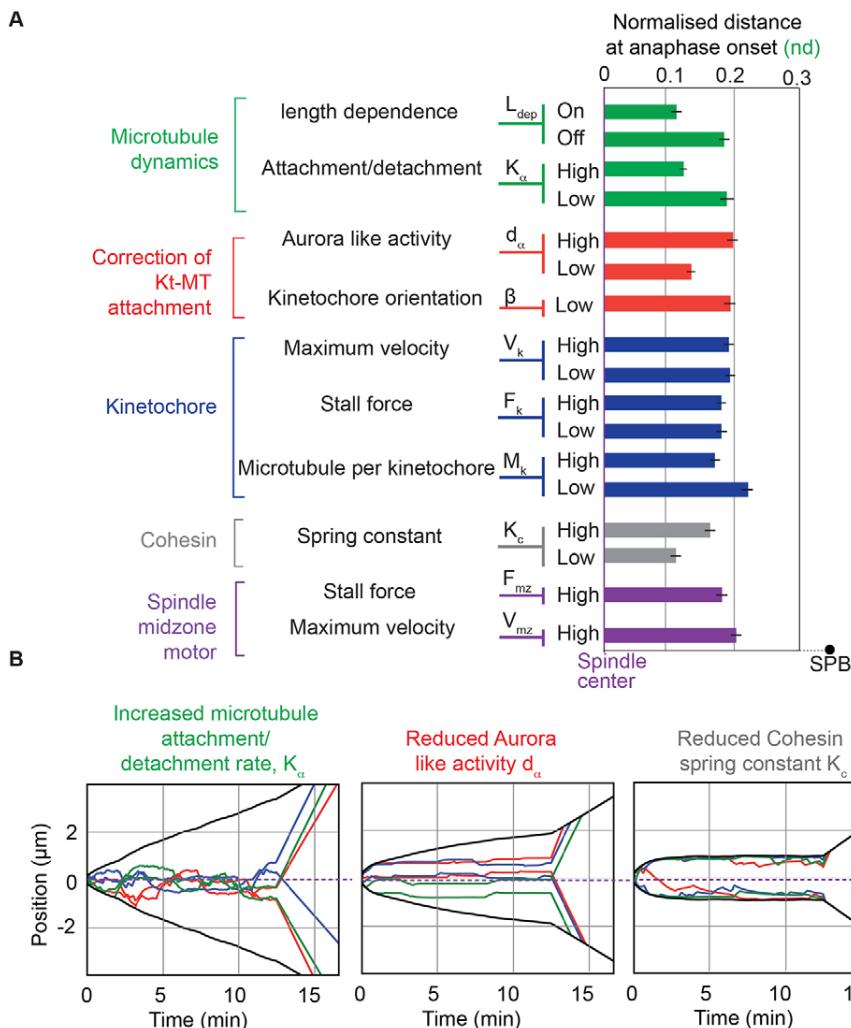
Fig. 7. A length-dependent pulling force centers kinetochores and prevents lagging chromosomes in a force-balance model. (A) Schematic representation of the metaphase spindle. The two SPBs (black) are linked by overlapping interdigititated MTs (orange). The chromosome (gray) is linked to the SPBs by its centromere regions (green). The three MT-binding sites located on each kinetochore (purple) are connected to the SPBs by ktMTs (blue lines). The two sister chromatids are held together by the cohesin complex (red). (B) Biophysical representation of the metaphase spindle. The SPBs are linked by the interdigititated MT force generator (F_{mz} , orange). Each MT attachment site on the kinetochore (purple) is linked to the SPB through a kinetochore MT (blue). The three MT-binding sites (purple) are associated with the chromosomes by the centromere (green) and represented by a spring and damper (purple). Cohesin between the sister chromatids (red) is modeled as a single spring linking both centromeres (K_c). A simple stochastic process of MT attachment and detachment reproduces the directional instability. At any time, MT attachment sites (purple) attach with the frequency k_a (force F_k is ON) or detach with the frequency k_d (force F_k is OFF). This attachment and detachment process leads to an imbalance of the forces applied on the chromosome and to chromosome dynamics within the spindle. The parameter d_α (Aurora-B-like activity) modulates the probability of MT detachment as a function of the distance between the MT attachment site and the center of the kinetochore pair. Thus, the parameter d_α is defined as the spatial range of Aurora B activity. The kinetochore orientation effect parameter (β) controls the probability for a new kinetochore-MT attachment to be correct or incorrect depending on the previous attachment state of the kinetochore to the poles. When β equals 1 and the kinetochore is attached to a single spindle pole, the next attachment cannot be erroneous. When β equals 0, correct or erroneous attachments are equiprobable (the model parameters are detailed in Gay et al., 2012). (C,D) Top panels, diagrams depicting the presence (D) or absence (C) in the force-balance model of a length-dependent pulling force (see Movie 4 for animated trajectories). Lower panel, typical *in silico* trajectories of the three pairs of kinetochores (blue, red and green) and the two SPBs (black) obtained in the presence (D) or absence (C) of a length-dependence pulling force. (E) Distance (nd) between kinetochores to spindle center at anaphase onset normalized according to spindle length *in vivo* [wild type (WT), $n=52$ and *klp6Δ*, $n=63$] or *in silico* (in the presence, $n=600$ or absence of length dependence, $n=600$). (F) Kinetochore lagging time from anaphase A onset *in vivo* (wild-type, $n=37$ and *klp6Δ* cells, $n=34$) or *in silico* (in the presence, $n=503$ or absence of length dependence, $n=451$). The plots in E and F are violin plots, which combine a standard box plot with a density trace. Each circle represents a value in the dataset, the horizontal bar represents the mean of the distribution and the vertical bar represents s.e.m.

Live-cell imaging

Live-cell microscopy was performed on an imaging chamber (CoverWell PCI-2.5; Grace Bio-Labs, Inc.) filled with 1 ml of 2% agarose in minimal medium and sealed with a 22×22 mm glass cover-slip. The temperature was maintained at 25°C during acquisitions. Images were acquired from an inverted wide-field microscope (Nikon Eclipse TI) equipped with a Neo sCMOS camera (Andor Technology Ltd), a LED light source (Lumencor

Spectra) and a 100× objective (1.45 NA). Images were recorded using the free open-source Micro-Manager software (Edelstein et al., 2010).

For quantitative analysis of kinetochore alignment (using Cen2-GFP or Ndc80-GFP), images were acquired every 10 s with 10 Z-section of 300 nm at each time step. It has been previously reported that the distance between Cen2-GFP and Ndc80-GFP spots is ~120 nm, less than the typical size of these spots (Gay et al., 2012). Thus, in this study the term kinetochores of



chromosome 2 has often been used instead of pericentromeric region of chromosome 2.

For high-frame rate acquisitions (analysis of chromosome oscillations), images were acquired with a single Z-section and a time step of 100 ms. The Z position was manually modified during acquisitions to maintain the focus on the spindle. In thiabendazole (TBZ) assays, cells were imaged in minimal medium supplemented with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ TBZ (from a stock solution of 10 mg ml^{-1} in DMSO). Cells were incubated for 30 min at 25°C before image acquisitions.

For *cen2-GFP*, *cdc11-GFP* and *mad2-RFP* acquisitions, images were acquired every 7 s with 3 Z-sections of 600 nm. To image Klp5-GFP on intra-nuclear MTs, images were acquired every 2 s with 3 Z-sections of 300 nm; Cdc11-CFP signal was acquired every 30 s. To record the position of kinetochores at the very beginning of mitosis, cells with Ndc80-GFP and Cdc11-CFP markers were used (Tournier et al., 2004). Acquisitions were made every 5 s with 5 Z-sections of 400 nm each.

Image analysis

Image analysis was performed using Fiji software (Schindelin et al., 2012), Python scripts in the scientific python ecosystem [SciPy library (Oliphant, 2007)] and custom software developed in the lab. All source code used in this paper is open source and freely available at https://github.com/hadim/spindle_tracker.

Peak detection and tracking

Cdc11-GFP (SPB) and Cen2-GFP (centromeres of chromosome 2) spots were first detected after a maximum Z-projection of images using

Fig. 8. Influence of several model parameters on kinetochore alignment. (A) Normalized distance between sister kinetochore position to the spindle center at anaphase onset. Several model parameters were either increased (High) or decreased (Low) as compared to the default value (Table S1) to study their influence on kinetochore alignment. Simulations were obtained with the length-dependent pulling force turned off. These parameters correspond to different processes within the spindle (i.e. MT dynamics, correction of kinetochore-MT attachment, regulation of kinetochore-dependent processes, sister chromatid cohesion and regulation of spindle midzone motors). The figure shows the mean values \pm s.e.m. for an average number of simulations of 500. (B) Simulations showing the impact of parameters found to increase kinetochore alignment in the absence of a length-dependent mechanism. Left panel, increasing the rate of attachment and/or detachment, K_α , had a dramatic effect on mitotic progression, such as failure to maintain spindle size in metaphase or presence of unattached kinetochores. Middle panel, the parameter d_α , which represents the typical range of action of Aurora B (red) favors kinetochore alignment when it is decreased. However, in this condition, kinetochore attachments are hyperstabilized, kinetochores exhibit almost no dynamicity and merotelic kinetochore attachment is frequent (see Gay et al., 2012). Right panel, diminishing the parameter k_c (the cohesin spring constant) also seems to favor kinetochore alignment. However, this phenotype is due to the unrealistic inter-kinetochore distance reaching the entire spindle length (about 2 μm) while the *in vivo* value only equals 0.5 μm . In this condition, each chromatid is pulled towards a pole and the position of the sister kinetochores corresponds to the spindle center.

LoG detector from TrackMate (Fiji plugin). Then, tracking was performed with custom software developed in Python. To link these spots with time, we assumed that the most distant spots were the SPBs, and that the two remaining were the centromeres. Each trajectory was then projected on the spindle axis defined by the two SPBs.

Quantification of fluorescence signal

Intra-nuclear MTs (iMt) were manually detected. For each iMt, a mean profile of Klp5-GFP intensity of 4-pixel width was computed. For normalization, intensities were divided by the median intensity of the profile. Then, for each range of length, the intensities of all iMts were averaged.

Quantification of MT dynamics

MT dynamics quantification was performed with a custom ImageJ macro working as follows. The image stack was smoothed using the ‘Gaussian Blur’ filter before applying a maximum Z-projection. The projected images were then filtered in the Fourier space to remove wavelengths larger than 12 pixels (0.8 μm) and smaller than 3 pixels (0.2 μm). Regions of interest (ROIs) were defined around individual interphasic MTs and the ‘Triangle’ auto-thresholding algorithm was applied in these regions. Binary images were then skeletonized to produce unidimensional shapes whose length L was extracted at each time-step. The curve $L(t)$ is manually divided into growing and shrinking periods, fitted with a linear function to extract growing and shrinking rates.

Kymographs

Kymograph representations were performed with a custom Fiji macro available upon request (https://github.com/hadim/fiji_tools/blob/master/macros/AutoInstall/custom-macros.ijm#L45).

Characterization of amplitudes and periods of oscillations

Fast Fourier transform analysis

To characterize kinetochore oscillations, we performed Fast Fourier transform (FFT) analysis on each tracked trajectory of chromosome 2 (middle of the two Cen2–GFP spots; blue line in Fig. S3A). To convert the power spectrum into an amplitude of movement (in μm), we normalized it by the length of the signal and multiplied by two (half of the spectrum is removed so energy must be preserved). Peaks were detected as local maxima of the FFT curve. Peaks with frequency lower than 5×10^{-3} Hz were excluded (high-pass filter). The peak of highest amplitude was used for the characterization of the oscillatory movement.

Detection of local maxima

To characterize kinetochore oscillations, we first smoothed kinetochore trajectories by fitting a spline function (red line in Fig. S3C). The middle time-point between the two peaks of two consecutive local extrema defines the start of a semi-period and the following middle time-point indicates the end of the semi-period (Fig. S3C).

Statistical analysis

Errors mentioned in text and figures indicate the s.e.m. except when specified. The violin plots used in this paper combines a standard box plot with a density trace. Each circle represents a value in the dataset and the horizontal bar represents the mean of the distribution. Statistical tests were performed using a Student's *t*-test (Python library SciPy, `scipy.stats.ttest_ind`). Statistical significance is defined as follows: NS, $P > 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ and $****P < 0.0001$.

Modeling

The source code of the mitotic model (Gay et al., 2012) is available under an open source license at https://github.com/bnoi/kt_simul.

General assumption

As previously described, Klp5 and Klp6 re-localize at the spindle midzone during anaphase (West et al., 2001). Thus, in the simulations the length-dependent mechanism described below was turned off during anaphase.

Length-dependent pulling force

In the initial model (Gay et al., 2012), the pulling force (F) applied on single attachment sites follows a linear force–velocity relationship:

$$F = \pi F_k \left(1 - \frac{v}{V_k} \right), \quad (1)$$

where F_k and V_k are the stall force and the motor maximum velocity, v is the speed of the attachment site and π is the attachment state (equal to 1 when the site is attached to the correct pole, –1 when it is attached to the opposite pole and 0 when it is detached).

The length-dependent mechanism was implemented by adding a prefactor L_{dep} to this pulling force:

$$F = L_{\text{dep}} \pi F_k \left(1 - \frac{v}{V_k} \right). \quad (2)$$

L_{dep} is calculated according to the actual distance between the attachment site and its corresponding pole ($d_{\text{site-pole}}$) following a linear relationship:

$$L_{\text{dep}} = 1 + \alpha(d_{\text{site-pole}} + d_{\text{mean}})$$

Where α is a free parameter governing the strength of the relation between the distance $d_{\text{site-pole}}$ and force magnitude. d_{mean} is the average *in vivo* distance measured between the kinetochore attachment site and the pole during metaphase. Finally, $d_{\text{site-pole}}$ is the actual distance between the kinetochore attachment site and the pole. In this study we used $d_{\text{mean}}=1\text{ }\mu\text{m}$

and $\alpha=0.2$. The value of α is optimized to reproduce kinetochore centering as observed *in vivo*.

Acknowledgements

We would like to thank T. Toda and P. Tran for supplying strains and Thomas Mangeat for critical reading of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

H.M. performed *in vivo* experiments, modeling and image analysis; J.F. performed experiments, modeling and image analysis; G.G. conceived modeling experiments; C.R., T.G., C.G. performed *in vivo* experiments; J.P. conceived modeling experiments; and S.T. and Y.G. conceived, designed experiments and prepared the manuscript.

Funding

H.M. was supported by the Fondation pour la Recherche Medicale. J.F. was supported by the plan Cancer 2009–2013 ‘Systems Biology’. This work was funded by the ANR-blanc120601 ‘Chromocatch’ and the plan Cancer 2009–2013 ‘Systems Biology’. J.P. was supported by the Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) and la Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) (ATIP/Avenir). The microscopy equipment was funded by the CNRS, l'ANR-blanc120601 and l'Association de la Recherche sur le Cancer (ARC). Deposited in PMC for immediate release.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.160465/-DC1>

References

- Amaro, A. C., Samora, C. P., Holtackers, R., Wang, E., Kingston, I. J., Alonso, M., Lampson, M., McAinsh, A. D. and Meraldi, P. (2010). Molecular control of kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations. *Nat. Cell Biol.* **12**, 319–329.
- Antonio, C., Ferby, I., Wilhelm, H., Jones, M., Karsenti, E., Nebreda, A. R. and Vernos, I. (2000). Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell* **102**, 425–435.
- Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Kwon, M., Mogilner, A. and Scholey, J. M. (2004). Model for anaphase B: role of three mitotic motors in a switch from poleward flux to spindle elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15938–15943.
- Cai, S., O'Connell, C. B., Khodjakov, A. and Walczak, C. E. (2009). Chromosome congression in the absence of kinetochore fibres. *Nat. Cell Biol.* **11**, 832–838.
- Civelekoglu-Scholey, G. and Cimini, D. (2014). Modelling chromosome dynamics in mitosis: a historical perspective on models of metaphase and anaphase in eukaryotic cells. *Interface Focus* **4**, 20130073.
- Civelekoglu-Scholey, G., Sharp, D. J., Mogilner, A. and Scholey, J. M. (2006). Model of chromosome motility in Drosophila embryos: adaptation of a general mechanism for rapid mitosis. *Biophys. J.* **90**, 3966–3982.
- Civelekoglu-Scholey, G., He, B., Shen, M., Wan, X., Roscioli, E., Bowden, B. and Cimini, D. (2013). Dynamic bonds and polar ejection force distribution explain kinetochore oscillations in PtK1 cells. *J. Cell Biol.* **201**, 577–593.
- Courtheoux, T., Gay, G., Reyes, C., Goldstone, S., Gachet, Y. and Tournier, S. (2007). Dynein participates in chromosome segregation in fission yeast. *Biol. Cell* **99**, 627–637.
- Courtheoux, T., Gay, G., Gachet, Y. and Tournier, S. (2009). Ase1/Prc1-dependent spindle elongation corrects merotely during anaphase in fission yeast. *J. Cell Biol.* **187**, 399–412.
- Desai, A., Maddox, P. S., Mitchison, T. J. and Salmon, E. D. (1998). Anaphase A chromosome movement and poleward spindle microtubule flux occur at similar rates in Xenopus extract spindles. *J. Cell Biol.* **141**, 703–713.
- Ding, R., McDonald, K. L. and McIntosh, J. R. (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* **120**, 141–151.
- Dumont, S. and Mitchison, T. J. (2009). Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol.* **19**, 1086–1095.
- Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R. and Stuurman, N. (2010). Computer control of microscopes using microManager. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **92**, 14.20.1–14.20.17. Chapter 14, Unit 14.20.
- Foethke, D., Makushok, T., Brunner, D. and Nédélec, F. (2009). Force- and length-dependent catastrophe activities explain interphase microtubule organization in fission yeast. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 241.
- Funabiki, H. and Murray, A. W. (2000). The Xenopus chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* **102**, 411–424.

- Gachet, Y., Reyes, C., Courtheoux, T., Goldstone, S., Gay, G., Serrurier, C. and Tournier, S.** (2008). Sister kinetochore recapture in fission yeast occurs by two distinct mechanisms, both requiring Dam1 and Klp2. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1646-1662.
- Garcia, M. A., Koonrungsa, N. and Toda, T.** (2002a). Spindle-kinetochore attachment requires the combined action of Kin I-like Klp5/6 and Alp14/Dis1-MAPs in fission yeast. *EMBO J.* **21**, 6015-6024.
- Garcia, M. A., Koonrungsa, N. and Toda, T.** (2002b). Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *Curr. Biol.* **12**, 610-621.
- Gardner, M. K., Pearson, C. G., Sprague, B. L., Zarzar, T. R., Bloom, K., Salmon, E. D. and Odde, D. J.** (2005). Tension-dependent regulation of microtubule dynamics at kinetochores can explain metaphase congression in yeast. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3764-3775.
- Gardner, M. K., Bouck, D. C., Paliulis, L. V., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., Haase, J., Soubry, A., Joglekar, A. P., Winey, M., Salmon, E. D. et al.** (2008). Chromosome congression by Kinesin-5 motor-mediated disassembly of longer kinetochore microtubules. *Cell* **135**, 894-906.
- Gay, G., Courtheoux, T., Reyes, C., Tournier, S. and Gachet, Y.** (2012). A stochastic model of kinetochore-microtubule attachment accurately describes fission yeast chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **196**, 757-774.
- Grissom, P. M., Fiedler, T., Grishchuk, E. L., Nicastro, D., West, R. R. and Richard McIntosh, J.** (2009). Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement. *Mol. Biol. Cell* **20**, 963-972.
- Gupta, M. L., Jr, Carvalho, P., Roof, D. M. and Pellman, D.** (2006). Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* **8**, 913-923.
- Ikui, A. E., Furuya, K., Yanagida, M. and Matsumoto, T.** (2002). Control of localization of a spindle checkpoint protein, Mad2, in fission yeast. *J. Cell Sci.* **115**, 1603-1610.
- Jaqaman, K., King, E. M., Amaro, A. C., Winter, J. R., Dorn, J. F., Elliott, H. L., McHedlishvili, N., McClelland, S. E., Porter, I. M., Posch, M. et al.** (2010). Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere stiffness and microtubule depolymerases. *J. Cell Biol.* **188**, 665-679.
- Joglekar, A. P. and Hunt, A. J.** (2002). A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements. *Biophys. J.* **83**, 42-58.
- Joglekar, A. P., Bloom, K. S. and Salmon, E. D.** (2010). Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 57-67.
- Kapoor, T. M., Lampson, M. A., Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E. D., McEwen, B. F. and Khodjakov, A.** (2006). Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* **311**, 388-391.
- Kitajima, T. S., Ohsugi, M. and Ellenberg, J.** (2011). Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* **146**, 568-581.
- Kops, G. J. L., Saurin, A. T. and Meraldi, P.** (2010). Finding the middle ground: how kinetochores power chromosome congression. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2145-2161.
- LaFountain, J. R., Jr, Oldenbourg, R., Cole, R. W. and Rieder, C. L.** (2001). Microtubule flux mediates poleward motion of acentric chromosome fragments during meiosis in insect spermatocytes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 4054-4065.
- Magidson, V., O'Connell, C. B., Loncik, J., Paul, R., Mogilner, A. and Khodjakov, A.** (2011). The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell* **146**, 555-567.
- Mallavarapu, A., Sawin, K. and Mitchison, T.** (1999). A switch in microtubule dynamics at the onset of anaphase B in the mitotic spindle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Biol.* **9**, 1423-1426.
- Mayr, M. I., Hümmer, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G. and Mayer, T. U.** (2007). The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr. Biol.* **17**, 488-498.
- McIntosh, J. R.** (2012). Motors or dynamics: what really moves chromosomes? *Nat. Cell Biol.* **14**, 1234.
- Mitchison, T., Wühr, M., Nguyen, P., Ishihara, K., Groen, A. and Field, C. M.** (2012). Growth, interaction, and positioning of microtubule asters in extremely large vertebrate embryo cells. *Cytoskeleton* **69**, 738-750.
- Mitchison, T. J.** (1989). Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* **109**, 637-652.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.
- Nabeshima, K., Nakagawa, T., Straight, A. F., Murray, A., Chikashige, Y., Yamashita, Y. M., Hiraoka, Y. and Yanagida, M.** (1998). Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3211-3225.
- Olyphant, T. E.** (2007). Python for scientific computing. *Comput. Sci. Eng.* **9**, 10-20.
- Paul, R., Wollman, R., Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Cimini, D. and Mogilner, A.** (2009). Computer simulations predict that chromosome movements and rotations accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 15708-15713.
- Pearson, C. G., Maddox, P. S., Salmon, E. D. and Bloom, K.** (2001). Budding yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. *J. Cell Biol.* **152**, 1255-1266.
- Reyes, C., Serrurier, C., Gauthier, T., Gachet, Y. and Tournier, S.** (2015). Aurora B prevents chromosome arm separation defects by promoting telomere dispersion and disjunction. *J. Cell Biol.* **208**, 713-727.
- Rieder, C. L., Davison, E. A., Jensen, L. C., Cassimeris, L. and Salmon, E. D.** (1986). Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. *J. Cell Biol.* **103**, 581-591.
- Sanchez-Perez, I., Renwick, S. J., Crawley, K., Karig, I., Buck, V., Meadows, J. C., Franco-Sanchez, A., Fleig, U., Toda, T. and Millar, J. B.** (2005). The DASH complex and Klp5/Klp6 kinesin coordinate bipolar chromosome attachment in fission yeast. *Embo. J.* **24**, 2931-2943.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B. et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676-682.
- Skibbens, R. V., Skeen, V. P. and Salmon, E. D.** (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J. Cell Biol.* **122**, 859-875.
- Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C. and Wordeman, L.** (2008). The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev. Cell* **14**, 252-262.
- Tatebe, H., Goshima, G., Takeda, K., Nakagawa, T., Kinoshita, K. and Yanagida, M.** (2001). Fission yeast living mitosis visualized by GFP-tagged gene products. *Micron* **32**, 67-74.
- Tischer, C., Brunner, D. and Dogterom, M.** (2009). Force- and kinesin-8-dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 250.
- Tournier, S., Gachet, Y., Buck, V., Hyams, J. S. and Millar, J. B. A.** (2004). Disruption of astral microtubule contact with the cell cortex activates a Bub1, Bub3, and Mad3-dependent checkpoint in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3345-3356.
- Umesono, K., Toda, T., Hayashi, S. and Yanagida, M.** (1983). Cell division cycle genes nda2 and nda3 of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole compounds. *J. Mol. Biol.* **168**, 271-284.
- Unsworth, A., Masuda, H., Dhut, S. and Toda, T.** (2008). Fission yeast kinesin-8 Klp5 and Klp6 are interdependent for mitotic nuclear retention and required for proper microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5104-5115.
- Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A. A., Tanaka, T. U. and Howard, J.** (2006). Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat. Cell Biol.* **8**, 957-962.
- Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S. and Howard, J.** (2009). Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell* **138**, 1174-1183.
- Vladimiro, E., Harry, E., Burroughs, N. and McAinsh, A. D.** (2011). Springs, clutches and motors: driving forward kinetochore mechanism by modelling. *Chromosome Res.* **19**, 409-421.
- Vladimiro, E., McHedlishvili, N., Gasic, I., Armond, J. W., Samora, C. P., Meraldi, P. and McAinsh, A. D.** (2013). Nonautonomous movement of chromosomes in mitosis. *Dev. Cell* **27**, 60-71.
- Wandke, C., Barisic, M., Sigl, R., Rauch, V., Wolf, F., Amaro, A. C., Tan, C. H., Pereira, A. J., Kutay, U., Maiato, H. et al.** (2012). Human chromokinesins promote chromosome congression and spindle microtubule dynamics during mitosis. *J. Cell Biol.* **198**, 847-863.
- West, R. R., Malmstrom, T., Troxell, C. L. and McIntosh, J. R.** (2001). Two related kinesins, klp5+ and klp6+, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3919-3932.
- West, R. R., Malmstrom, T. and McIntosh, J. R.** (2002). Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *J. Cell Sci.* **115**, 931-940.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S. et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.
- Wühr, M., Dumont, S., Groen, A. C., Needleman, D. J. and Mitchison, T. J.** (2009). How does a millimeter-sized cell find its center? *Cell Cycle* **8**, 1115-1121.
- Yamamoto, A. and Hiraoka, Y.** (2003). Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast. *EMBO J.* **22**, 2284-2296.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

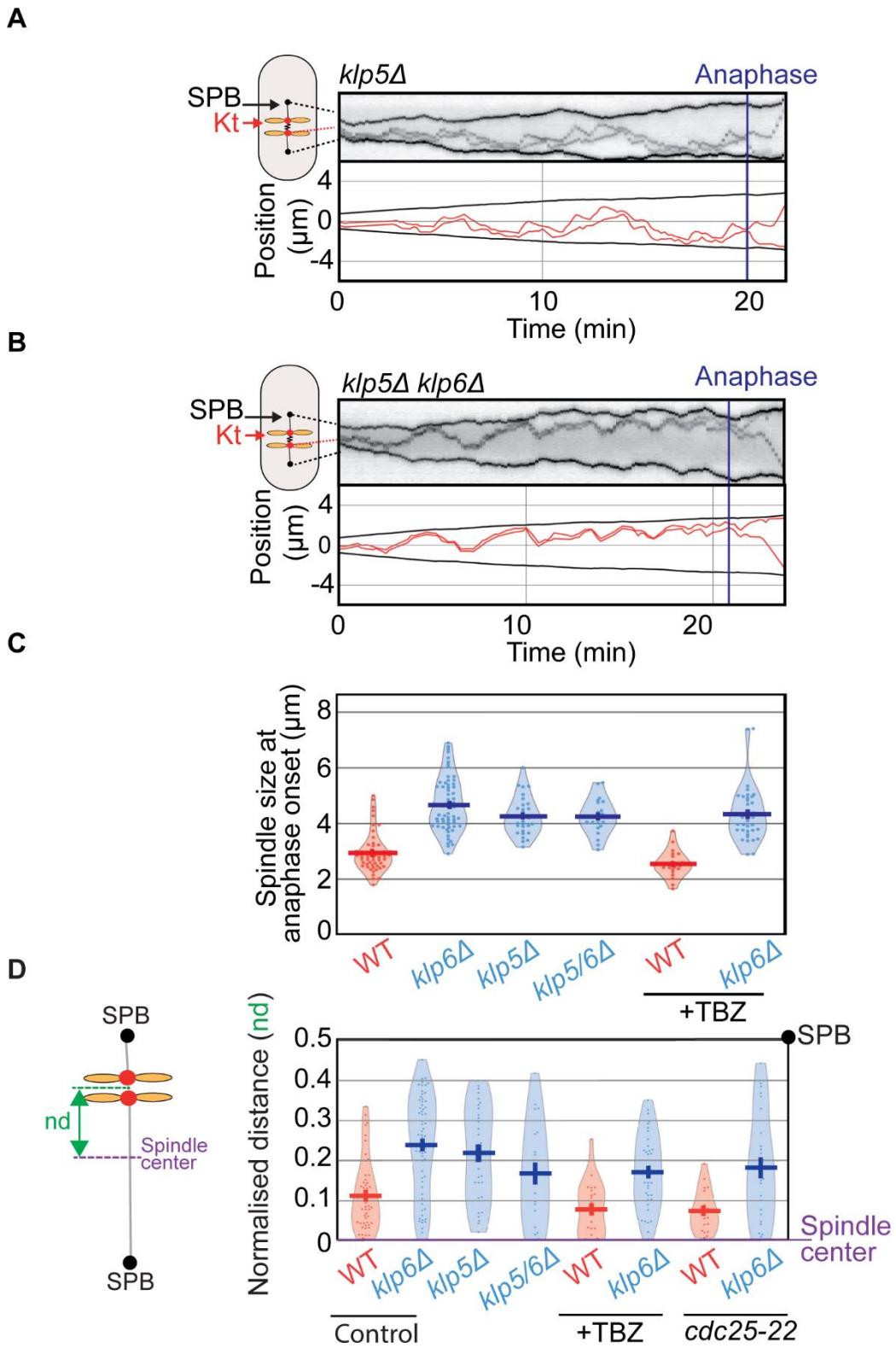


Figure S1. *klp5Δ* or double mutant *klp5Δ klp6Δ* are deficient for chromosome centering.

(A-B) Typical time-lapse fluorescent images of *klp5Δ* or *klp5Δ klp6Δ* double mutant expressing Cen2-gfp (centromeric region of chromosome 2) and Cdc11-gfp (SPBs) during metaphase and anaphase. $\Delta t = 10$ s. The lower panel is showing the corresponding trajectories of Cen2 (red) and SPBs (black) projected on a 1-D axis whose origin is the spindle center. **(C)** Spindle size at anaphase onset for various cell type: wild type (n=52, with TBZ n=21), *klp6Δ* (n=63, with TBZ, n=36), *klp5Δ* (n=30), *klp5/6Δ* (n=21). **(D)** Global distribution of the relative distances between Cen2 to the spindle center at anaphase onset in wild type (n=52), *klp6Δ* cells (n=63), *klp5Δ* cells (n=30), *klp5/6Δ* cells (n=21), wild type cells with low dose of TBZ (n=21), *klp6Δ* cells with low dose of TBZ (n=36), *cdc25-22* cells (n=19) and *cdc25-22 klp6Δ* cells (n=26). Each distance d between sister kinetochores to the spindle center is normalized according to spindle size so that sister kinetochore position varies between 0 (spindle center) to 0.5 (poles).

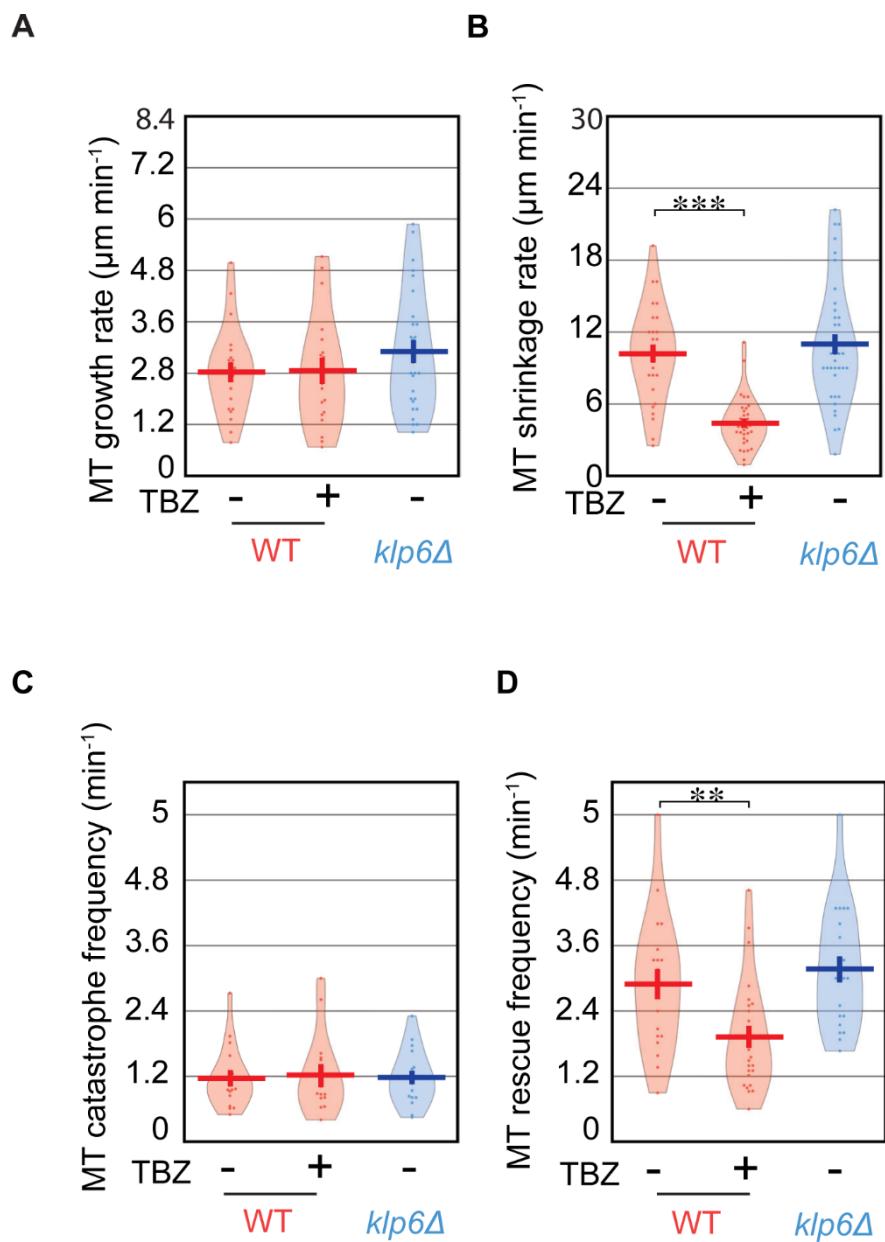


Figure S2. Analysis of microtubule dynamics in the presence or absence of TBZ.

- (A). Microtubule growth rate for wild type (n=22, with TBZ n=19) and *klp6Δ* (n=27) cells.
- (B). Microtubule shrinkage rate for wild type (n=29, with TBZ n=33) and *klp6Δ* (n=37) cells.
- (C). Microtubule catastrophe frequency for wild type (n=19, with TBZ n=15) and *klp6Δ* (n=17) cells. (D). Microtubule rescue frequency for wild type (n=20, with TBZ n=26) and *klp6Δ* (n=21) cells.

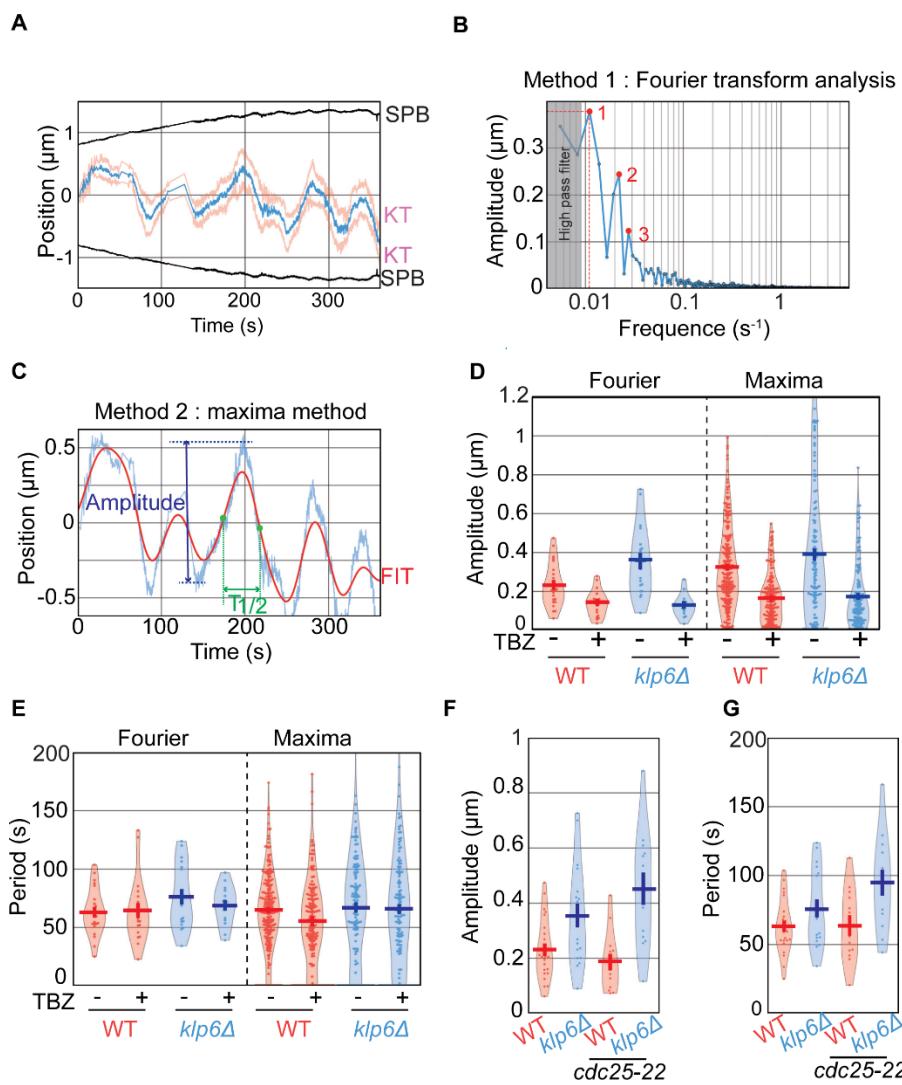


Figure S3. Characterization of kinetochore oscillation periods and amplitudes.

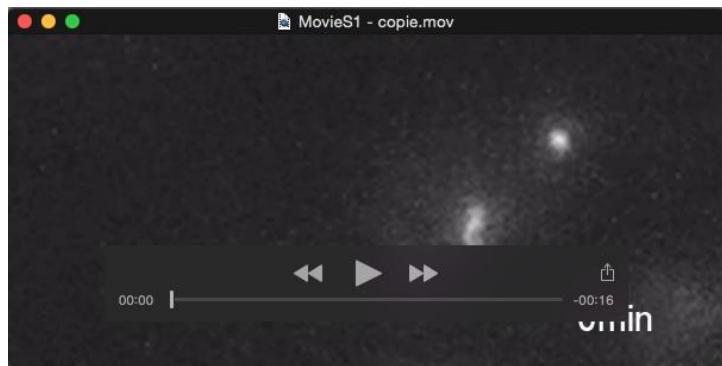
(A). Kinetochore (Cen2) trajectories used to illustrate oscillation analysis (frames were taken every 0.1 s). The blue line represents the middle of the Cen2 spots (shown in red). **(B)** Fourier transform analysis of kinetochore trajectories. The peak of highest amplitude is identified in the Fourier spectrum of each kinetochore trajectories obtained from high frame rate experiments. The corresponding amplitudes are reported as a function of the half periods of oscillations. **(C)** Position of the middle of Cen2 spots according to time (blue). This trajectory is interpolated by a spline function (red). The local maxima of the interpolated curve are identified and used to determine half periods ($T_{1/2}$, horizontal arrow) and amplitudes (A, vertical arrow) in kinetochore trajectories. **(D-E).** Amplitude and period comparison between the two methods (see B and C) in various cell lines (wild type and *klp6Δ*) and different conditions (presence or absence of low doses of TBZ). Note that the two methods reproduce qualitatively but not quantitatively the differences between wild type or mutant cells. **(F-G).** Amplitudes and periods in wild type and *klp6Δ* cells in control or *cdc25-22* background. Amplitudes and periods are not significantly different when cells are elongated in a *cdc25-22* background. Amplitude: wild type (n=24, *cdc25-22* n=13), *klp6Δ* (n=18, *cdc25-22* n=13). Period: wild type (n=24, *cdc25-22* n=13), *klp6Δ* (n=18, *cdc25-22* n=13).

Table S1: List of parameters and default values used in the study

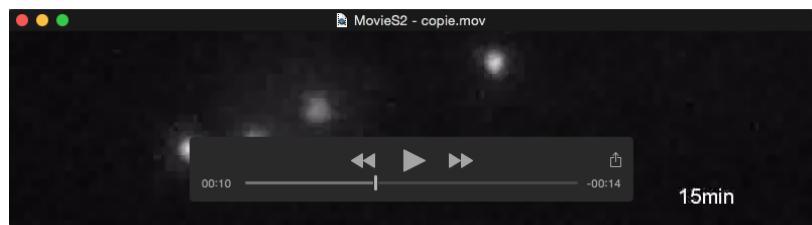
| Parameter | Description | value |
|------------|---|-------|
| L_{dep} | Factor controlling force load on kinetochore in a length dependent manner | 0.2 |
| K_α | Microtubule Attachment/detachment rate per min | 3.6 |
| d_α | Range of action of Aurora like activity (μm) | 0.05 |
| β | Kinetochore orientation parameter | 1 |
| V_k | Kinetochore maximum velocity ($\mu\text{m}/\text{min}$) | 2.4 |
| F_k | Kinetochore stall force (pN) | 10 |
| K_c | Cohesin spring constant (pN/ μm) | 67 |
| M_k | Number of microtubules per kinetochore | 3 |
| F_{mz} | Midzone force generator stall force (pN) | 58 |
| V_{mz} | Midzone force generator maximum velocity ($\mu\text{m}/\text{min}$) | 1.2 |

Table S2: Strains used in this study

| Strain number | Genotype | Reference |
|---------------|---|------------|
| ST1237 | <i>cdc11-gfp::kr cen2(D107)-kanR-ura4+-lacO his7+-lacI-gfp-gfp</i> | This study |
| ST1266 | <i>cdc11-gfp::kr cen2(D107)-kanR-ura4+-lacO his7+-lacI-gfp-gfp klp5::ura4</i> | This study |
| ST1442 | <i>cdc11-gfp-kr cen2(D107)-kanR-ura4+-lacO his7+-lacI-gfp-gfp cdc25-22</i> | This study |
| ST1522 | <i>cdc11-gfp-kr cen2(D107)-kanR-ura4+-lacO his7+-lacI-gfp-gfp cdc25-22 klp6::his3</i> | This study |
| ST1375 | <i>h- klp5-GFP::kr leu1-32 ura4-D18 pPT77 nmt1-ura4-mRFP-atb2</i> | This study |
| ST945 | <i>klp5-GFP cdc25-22 ndc80-CFP-kr cdc11-CFP-kr</i> | This study |
| ST1513 | <i>cdc11-gfp-kr cen2(D107)-kanR-ura4+-lacO his7+-lacI-gfp-gfp klp6::his3 mad2mcherry:CLONAT</i> | This study |
| ST1513 | <i>ndc80-GFP:kr cdc11-CPF:kr</i> | This study |
| ST1539 | <i>ndc80-GFP:kr cdc11-CPF:kr klp6::his3</i> | This study |
| ST1516 | <i>cdc11-gfp-kr cen2(D107)-kanR-ura4+-lacO his7+-lacI-gfp-gfp klp5::ura4</i> | This study |
| ST1518 | <i>cdc11-gfp-kr cen2(D107)-kanR-ura4+-lacO his7+-lacI-gfp-gfp klp5::ura4 klp6::his3</i> | This study |



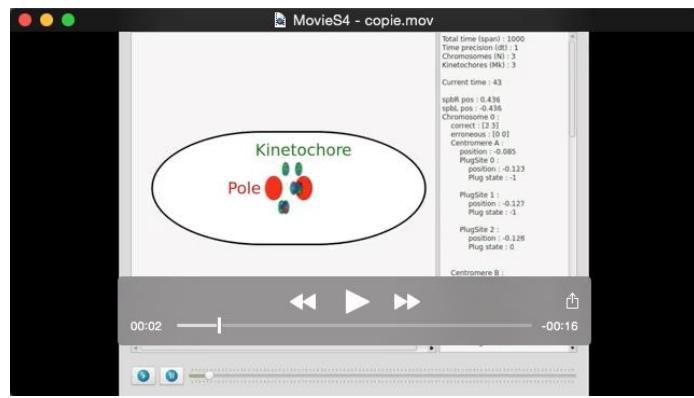
Movie 1. Fluorescent time-lapse imaging of centromere 2 (Cen2-gfp) and spindle pole (Cdc11-gfp) dynamics in a wild type fission yeast cell. Frames were taken every 10 s.



Movie 2. Fluorescent time-lapse imaging of centromere 2 (Cen2-gfp) and spindle pole (Cdc11-gfp) dynamics in a *klp6Δ* cell. Frames were taken every 10 s.



Movie 3. Fluorescent time-lapse imaging of tubulin (Atb2-rfp) and Kinesin-8 (Klp5-gfp) during metaphase showing Klp5 accumulation at the tip of an intranuclear microtubule bundle. Frames were taken every 5 s.



Movie 4. Cartoon recapitulating a typical simulation calculated with the force balance model of the mitotic spindle. The position of spindle poles and kinetochores are shown, as well as the attachment state of each attachment site (green = correct attachment, red = incorrect attachment, blue = unattached).

2.2 Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase

L'analyse des mouvements des chromosomes permet d'inférer les mécanismes régulant la dynamique du fuseau mitotique. En effet l'ensemble des interactions physico-chimiques de toutes les molécules et protéines composant le fuseau permet l'émergence de phénomènes de plus haut niveau comme le mouvement et l'attachement des chromosomes durant la mitose. Tout ces mécanismes sont requis pour une division cellulaire stable et fidèle.

L'analyse du mouvement se déroule en trois étapes et peut être appliquée à un grand nombre de type cellulaire :

- Avant l'étape d'acquisition, il est nécessaire de générer des lignées cellulaires dont les kinétochores ou bien la partie centromérique de la chromatide d'un ou de plusieurs chromosomes sont marqués avec une sonde fluorescente. L'acquisition se déroule généralement à l'aide d'un microscope à champs large ou confocal dont on règle les paramètres d'acquisition afin d'obtenir une photo des cellules à des pas de temps définis. Plus le pas de temps est faible, plus large sera l'éventail des phénomènes biophysiques observables. Cependant, des pas de temps trop faibles sur des durées trop longues auront tendance à endommager les cellules par la phototoxicité.
- L'étape de reconstruction de la trajectoire des chromosomes comprend la détection des différents éléments observés (souvent kinétochore et pôle du fuseau mitotique) pour chaque pas de temps suivi de la jointure des objets détectés dans le temps.
- Enfin la dernière étape d'analyse proprement dite n'est pas aussi bien défini que les deux étapes précédentes. Elle consiste à utiliser différents outils ou algorithmes afin de comparer et d'analyser les propriétés des trajectoires reconstruites pour en déduire différents mécanismes régulant la dynamique des chromosomes.

Cette stratégie d'analyse a été appliquée dans l'étude présentée en Section 2.1. Ce qui suit propose de détailler les différents outils utilisés ainsi que de présenter de nouvelles techniques d'analyse.

2.2.1 La reconstruction de la trajectoire des trois chromosomes de la levure à fission : un challenge ?

Après l'acquisition en vidéo-microscopie, la première étape consiste donc à détecter chacun des spots qui correspondent à un kinétochore ou à un des deux pôles du fuseau mitotique.

La résolution de la vidéo-microscopie actuelle ainsi que la taille du fuseau mitotique de la levure à fission (entre 1 et 4 μ m) rend la différenciation entre les six kinétochores très difficile tout au long de la métaphase (Figure 2.1A).

Il est possible de visualiser uniquement un chromosome en utilisant une sonde fluorophore située sur une zone spécifique de ce chromosome au niveau de sa partie péri-centromérique. Une lignée pré-existante (Yamamoto and Hiraoka, 2003) a donc été utilisée afin de marquer le chromosome II de la levure à fission à l'aide d'un système LacO/LacI (Robinett, 1996). Cette lignée permet une différenciation beaucoup plus facile entre les deux kinétochores du chromosome visualisé (Figure 2.1B).

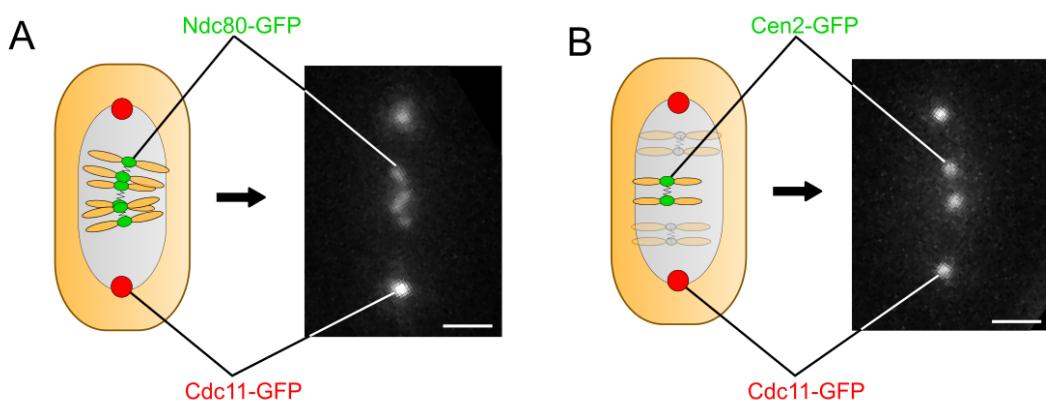


Figure 2.1: Image en microscopie à fluorescence de deux fuseaux mitotiques. **A.** Cellule marquée en GFP pour les six kinétochores (Ndc80-GFP, en vert sur le schéma) et pour les pôles (Cdc11-GFP, en rouge sur le schéma). **B.** Cellule marquée en GFP pour le centromère du chromosome II (Cen2-GFP, en vert sur le schéma) et pour les pôles (Cdc11-GFP, en rouge sur le schéma). La barre d'échelle correspond à 1~ μ m.

De l'information est donc perdue (la position des kinétochères des deux autres chromosomes) au profit d'une précision fortement accrue de la position des deux kinétochères restant.

Enfin on remarque que la visualisation des pôles se fait dans la même longueur d'onde que les kinétochères (marqués en GFP) afin de ne pas avoir à imager dans deux longueurs d'ondes différentes dans le but de réduire les dommages causés par la phototoxicité du système d'acquisition ainsi que de réduire le temps d'intervalle minimal entre deux acquisitions.

2.2.1.1 Détection par fit gaussien

En imagerie on définit un blob comme étant « une région d'une image formée par un ensemble de pixels connectés spatialement ». Plus communément un blob est un point qui correspond à une région intéressante de l'image. Par exemple, la Figure 2.1B contient

quatre blobs, deux correspondant aux pôles du fuseau mitotique et deux autres correspondant à la partie péri-centromérique des deux chromatides sœurs du chromosome II. L'étape de la détection est d'arriver à obtenir les propriétés géométriques de ces quatre objets (position, largeur et intensité).

L'un des algorithmes les plus utilisés pour la détection de blob se base sur la convolution de l'image par un noyau Gaussien suivi de l'application de l'opérateur Laplacien (on parle de « Laplacian of Gaussian »). Cette approche est très précise mais est aussi très sensible au paramètre d'échelle, c'est à dire que son résultat va fortement dépendre de la relation entre la taille des structures des blobs et la taille du noyau gaussien.

L'idée de convoluer l'image source avec un noyau gaussien vient de l'observation que les blobs des sondes utilisées en biologie peuvent parfois avoir une forme qui s'approche d'une distribution gaussienne en deux dimensions (Figure 2.2).

La qualité de la détection dépend aussi de la qualité du rapport signal/bruit de l'image ainsi que de la fidélité de la sonde fluorescente à reproduire une distribution gaussienne. Par exemple on peut remarquer que la sonde Cen2-GFP (Figure 2.2B) possède souvent une gaussienne moins bien définie que la sonde Cdc11-GFP (Figure 2.2C)). Ceci pourrait être causé par le fait que la sonde Cen2-GFP consiste en une répétition d'insertion d'un gène (LacO) proche du centromère du chromosome II. Il en résulterait un signal moins centré autour d'un unique point de l'espace et plus diffus le long du chromosome II.

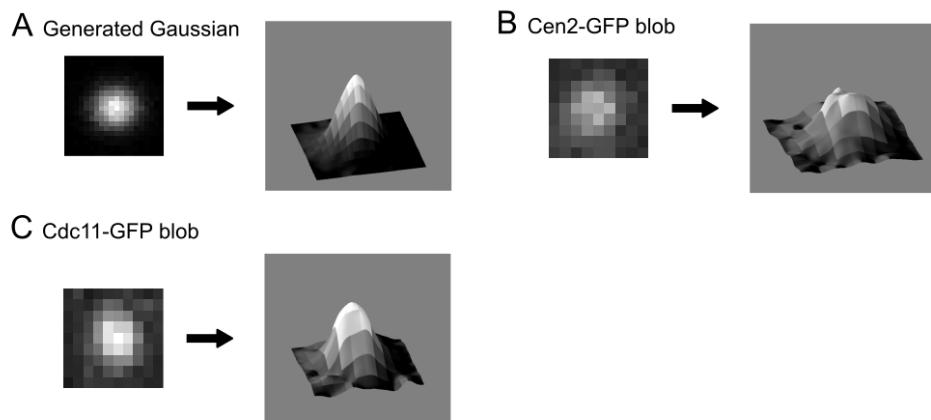


Figure 2.2: Distribution des intensités gaussiennes en deux dimensions. **A.** Cette image a été générée *in silico* par l'échantillonnage aléatoire d'une distribution gaussienne. Le surface plot (image de droite) contient une dimension supplémentaire en z dont la hauteur est proportionnelle à l'intensité des pixels dans l'image originale (image de gauche). **B.** Cette image correspond à un blob de la sonde Cen2-GFP qui marque le centromère d'une des chromatides du chromosome II. **C.** Cette image correspond à un blob de la sonde Cdc11-GFP qui marque les deux pôles du fuseau mitotique.

Une implémentation existe dans le plugin TrackMate inclus dans Fiji (Schindelin et al.,

2012). Son code est librement disponible.¹

Cette implémentation a été utilisée pour l'analyse des images de vidéo-microscopie durant ce travail. La précision de la détection a aussi été testée en détectant des blobs sur des films générés depuis des trajectoires simulées *in silico* (Figure 2.3A). La distance entre la position réelle *in silico* puis la position détectée a ensuite été comparée (Figure 2.3B). La largeur à mi hauteur (FWHM, *full width at half maximum*) de la distribution de l'erreur de détection est de 34~nm.

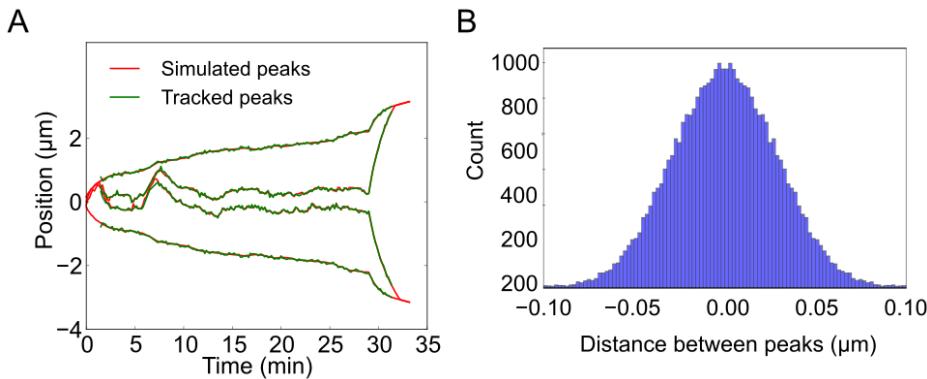


Figure 2.3: Précision de la détection des blobs. **A.** Superposition d'une trajectoire de chromosome et pôle simulée *in silico* (en rouge) avec la trajectoire reconstruite par détection de blob (en vert). **B.** Distribution de la distance entre les blobs simulés et les blobs détectés.

Enfin un autre algorithme de détection de blob a aussi été testé durant ce travail. Il est basé sur le travail de Arnaud Sergé dans le groupe dirigé par Didier Marguet à Marseille (Sergé et al., 2008) dont le principal atout consiste à être capable de détecter plusieurs blobs très proches les uns des autres comme cela peut être le cas lorsque l'on visualise les six kinétochores de la levure à fission (Figure 2.1A).

L'idée principale est d'appliquer un algorithme de détection de blob plusieurs fois. Entre chaque tour de détection, on soustrait les blobs détectés à l'image source (étape de déflation) et on re-déetecte les blobs restant (Figure 2.4). L'algorithme s'arrête quand plus aucun blob n'est détecté dans l'image. Cela permet la détection des blobs d'intensité plus faible qui sont masqués par celui de plus forte intensité situé à proximité.

Une implémentation en Python de cet algorithme est librement disponible en ligne.²

Deux raisons ont empêchés cet algorithme d'être utilisé dans le cadre de ce travail. La première est que l'implémentation en Python est beaucoup plus lente (quasiment un facteur 100) que la détection de blob proposée par le plugin TrackMate. Afin de remédier à cela il faudrait ré-implémenter l'algorithme de façon plus efficace, probablement en utilisant un langage de plus bas niveau tel que Cython ou le C. Cette perte de temps

¹<http://git.io/vC9zf>

²<http://git.io/vCHGs>

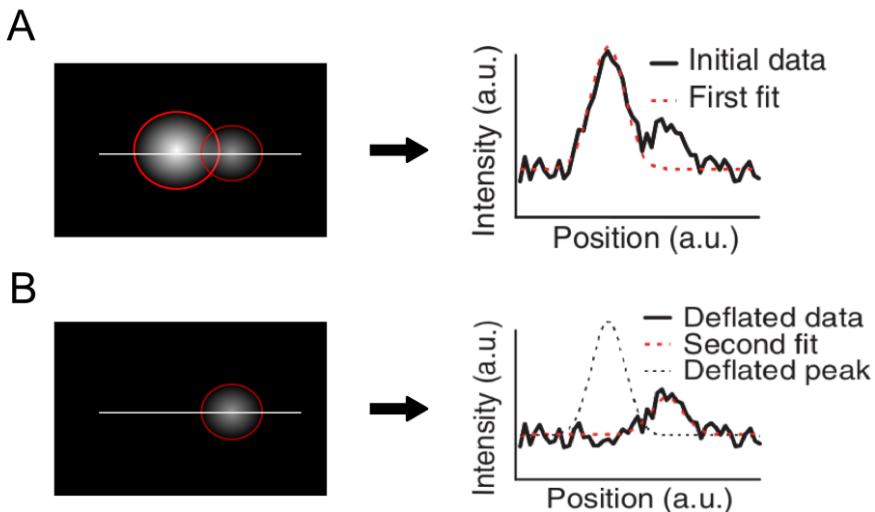


Figure 2.4: Principe de l’algorithme de détection de blob par déflation. **A.** Le premier tour de fit gaussien détecte le blob le plus grand et le plus intense. **B.** Une fois le premier blob détecté soustrait de l’image source, le second tour de fit gaussien détecte le blob plus petit et moins intense. Les line plots situés à droite des schémas sont adaptés de Sergé et al. (2008).

aurait pu éventuellement être acceptable si la détection de blobs superposés dans les images à six kinétochore (Figure 2.1A) fonctionnait bien. Or l’algorithme de déflation ne donne pas de résultat convaincant comparé à celui proposé par TrackMate (Figure 2.5). Ceci pourrait s’expliquer par le fait que la déflation est réellement efficace sur des sondes à molécules unique (« Single Particle Tracking » ou aussi SPT en anglais) et non pas des agrégats de multiples sondes fluorophores comme c’est le cas pour Cen2-GFP.

Une fois les blobs détectés pour chaque pas de temps, il faut encore relier les blobs entre eux au cours du temps afin d’obtenir les trajectoires uniques de chaque kinétochore et des pôles du fuseau mitotique; c’est l’étape de suivi de trajectoire aussi appelé « tracking ».

2.2.1.2 Reconstruction des trajectoires

Durant le tracking, les trajectoires des objets observés (les chromosomes et les pôles) sont reconstruites. C’est à dire que chaque blob est relié avec le blob qui correspond au même objet dans tout les pas de temps (Figure 2.6).

Tout les algorithmes de tracking sont basés sur la même idée que d’un pas de temps à l’autre, deux blobs correspondent au même objet si leurs distances est la plus petite parmi toutes les distances possibles avec les autres blobs.

Le tracking consiste donc à minimiser un ensemble de solutions parmi le champ des possibles. La version la plus utilisée se base sur la minimisation de la distance euclidienne d’un pas de temps à l’autre.

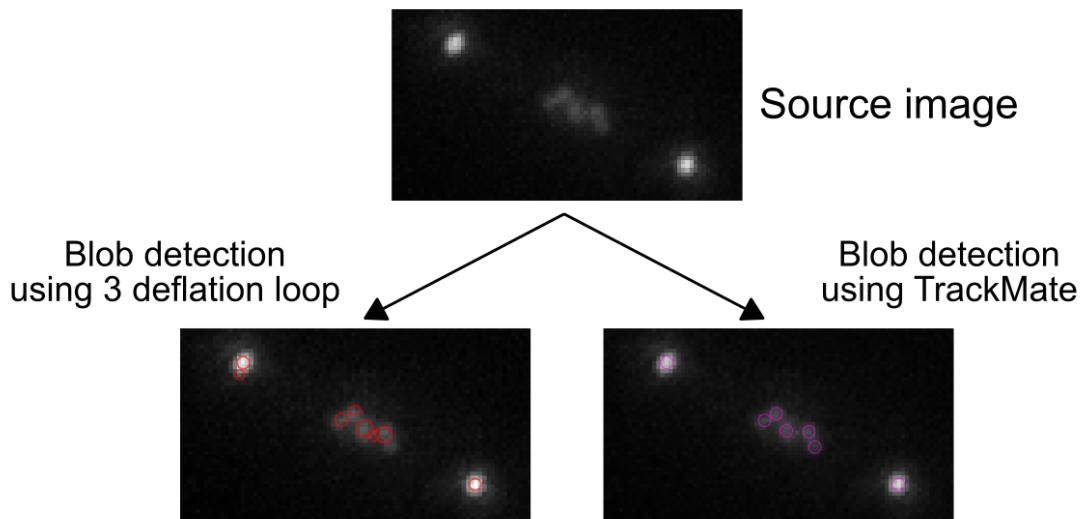


Figure 2.5: Comparaison entre le LoG détection de TrackMate et l'implémentation par déflation basé sur l'algorithme de Sergé et al. Aucun des deux algorithmes n'arrivent à détecter les six kinétochore et les deux pôles. Par contre l'algorithme de TrackMate (à droite) détecte cinq kinétochore et les deux pôles. Alors que l'autre algorithme (à gauche) fait plus d'erreurs en détectant deux pôles au lieu de un (en haut) et en omettant un kinétochore au milieu.

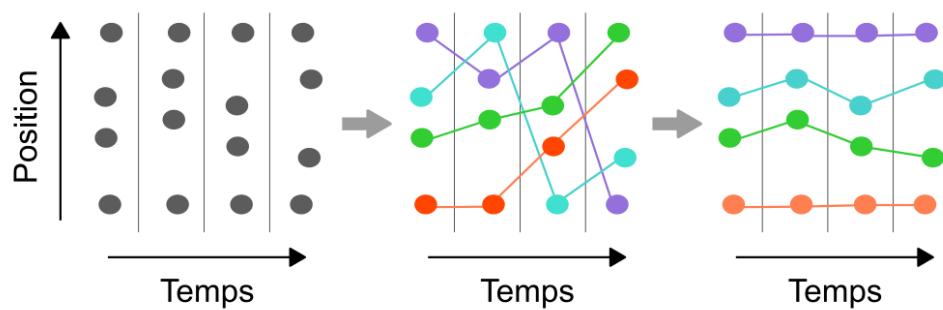


Figure 2.6: Le tracking est l'étape de liaison des objets d'intérêts dans le temps. Sans cette étape il est impossible de savoir si un objet est le même qu'un autre dans deux temps différents.

Observation de trois paires de chromosomes

Le tracking des six kinétochores est un challenge. En effet comme déjà vu en Figure 2.1A, les six kinétochores évoluent ensemble dans un espace de petite taille, le fuseau mitotique. De plus ils ont tendance à se superposer très souvent. On notera qu'il n'est pas possible de les différencier même en filmant dans la profondeur du champs focal (en z).

Cependant il est possible de reconstruire partiellement des morceaux de trajectoires. Pour cela il est possible d'utiliser un algorithme de tracking développé par K. Jaqaman dans le groupe de Danuser appelé LAP tracker pour *Linear Assignment Problem tracker* (Jaqaman et al. (2008)).

L'idée du LAP tracker est de minimiser successivement deux matrices de coût contenant l'ensemble des solutions possibles au problème (Figure 2.7).

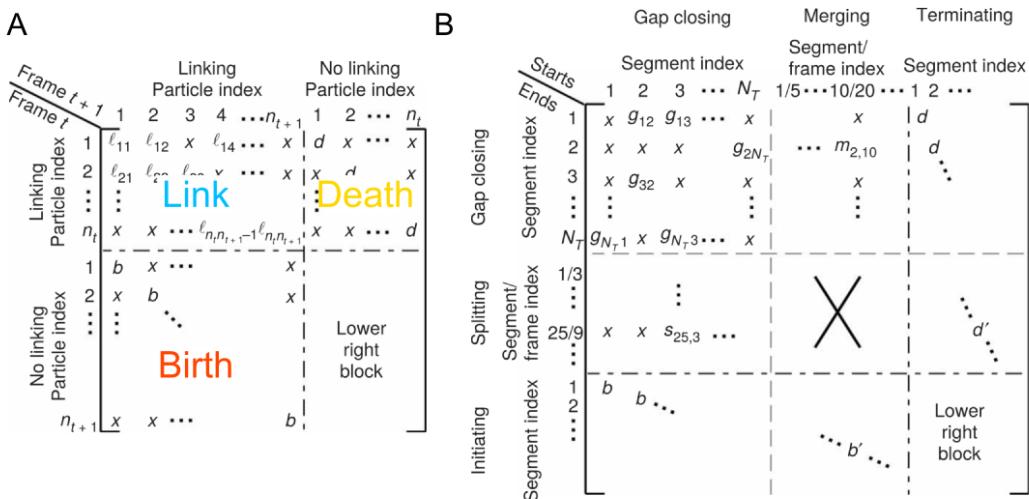


Figure 2.7: Les deux matrices de coût du LAP tracker. **A.** Matrice de coût contentant l'ensemble des liens possibles entre deux blobs pour deux pas de temps successifs t et $t+1$. Il existe donc autant de cette première matrice que de pas de temps dans la trajectoire. Le bloc en bas à droite (LRB) est un bloc auxiliaire requis pour satisfaire des contraintes topologiques de l'algorithme. **B.** Matrice de coût contrôlant la fermeture des trous, la fusion et la séparation des trajectoires. Adapté de Jaqaman et al. (2008).

Dans la première matrice (Figure 2.7A), chaque ligne et colonne correspond à un blob allant de 1 à n_{t+1} pour deux pas de temps successifs t et $t+1$. Chaque intersection de la matrice va contenir un score qui va mesurer la probabilité que l'événement en question arrive. Par exemple pour le bloc en haut à gauche (le bloc de liaison), chaque case correspond à un événement de liaison entre les deux blobs correspondant. Tandis que dans le bloc en bas à gauche, le score correspond à la probabilité que ce blob soit le premier d'une trajectoire (c'est à dire qu'il n'est lié à aucun autre blob dans le passé), on parle alors de naissance « birth ». Le bloc en haut à droite correspond aux probabilités de mort d'une trajectoire, c'est à dire que le blob soit le dernier d'une trajectoire (pas de

liaison dans le futur), on parle alors de mort « death ».

Le score du bloc de liaison peut être défini de plusieurs manières. Si on suppose un mouvement brownien on peut simplement définir le score comme la distance au carré qui séparent les deux particules. Si on étudie un mouvement dirigé on peut utiliser par exemple un score basé sur la distance entre le blob $t+1$ et une position prédictive et probable qui correspondrait à un mouvement dirigé (basé sur un filtre de Kalman par exemple).

Une fois les matrices créées (on note qu'il existe $t - 1$ matrices dans le cas de la première matrice). Elles sont minimisées en utilisant l'algorithme de Jonker-Volgenant (Jonker and Volgenant (1987)). La minimisation des matrices va alors calculer la combinaison des événements les plus probables en se basant sur les scores. On obtient ainsi des trajectoires.

La seconde matrice (Figure 2.7B) gère des événements plus complexes liés aux trajectoires et non plus aux blobs. Ici chaque ligne et colonne correspond à une trajectoire. Le calcul des scores cherche à exprimer la probabilité d'événements tel que le lien entre le début d'une trajectoire et la fin d'une autre, la fusion ou la séparation de deux trajectoires.

Deux implémentations ont été testées (Figure 2.8). La première provenant d'un module Python créé pour l'occasion, appelé `scikit-tracker`, possédant une fonction de score supposant un mouvement brownien (Figure 2.8A). La seconde est celle disponible dans TrackMate et contient une fonction de score qui suppose un mouvement dirigé basé sur un filtre de Kalman pour prédire les trajectoires (Figure 2.8B).

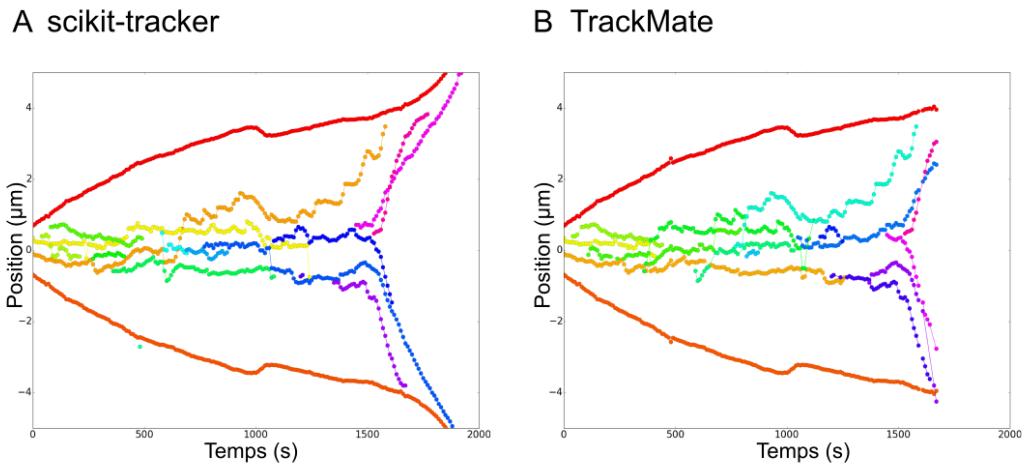


Figure 2.8: Reconstruction de la trajectoire avec six kinétochores. **A.** La reconstruction est basée sur une implémentation développée dans le cadre de cette étude appelé `scikit-tracker`. **B.** Reconstruction avec le plugin Fiji nommé TrackMate.

On observe que certains morceaux de trajectoires sont correctement reconstruits. Cependant, il existe des segments de trajectoires qui ne sont pas correctement reliés, ce qui est visible dans les graphes.

dant dans les deux reconstructions, les six kinétochores ne sont jamais clairement visibles. Soit certains sont superposés à d'autres et donc ils apparaissent comme un unique blob, soit certains d'entre eux sortent du champ focal du microscope. Il est très compliqué de différencier entre les deux scénarios.

Bien que cet algorithme soit puissant pour résoudre des problèmes complexes de reconstruction de trajectoires, son utilisation implique que l'étape de détection soit précise et que les différents blobs à reconstruire soit différenciable dans la plupart des pas de temps. La limite de résolution des microscopes traditionnelles ainsi que la taille du fuseau mitotique de la levure à fission ont rendu la reconstruction des trois chromosomes difficiles pour une étude fine de la dynamique des mouvements des chromosomes en mitose.

Afin d'obtenir des trajectoires exactes de chromosomes tout au long de la mitose l'une des solutions est d'imager seulement les deux kinétochores d'un seul chromosome mais cela implique bien sûr une perte d'information, comme par exemple, comment bougent les chromosomes les un par rapport aux autres.

Observation d'une paire de chromosome

En observant un seul chromosome (Figure 2.1B), la détection des blobs et le tracking deviennent beaucoup plus facile et robuste. En présence de seulement quatre blobs (deux pour les pôles et deux pour le centromère II) on peut alors facilement concevoir un algorithme simple et qui fonctionne dans la majorité des cas.

Cette approche a été utilisée dans la majorité des reconstructions de trajectoire de chromosomes utilisées dans ce travail.

L'algorithme utilisé est le suivant (Figure 2.9) :

- pour chaque pas de temps, on détermine les deux blobs les plus éloignés. Ils sont marqués comme étant les pôles du fuseau. Les deux autres blobs restant sont marqués comme étant les kinétochores.
- un côté (droite ou gauche) est assigné à chacun des pôles. Le kinétochore le plus proche de lui se voit assigner le côté correspondant.

Cette technique est très robuste (Figure 2.10). Cependant il arrive parfois que quelques erreurs subsistent dans les trajectoires. On peut alors avoir recours à une interface de correction manuelle des trajectoires.

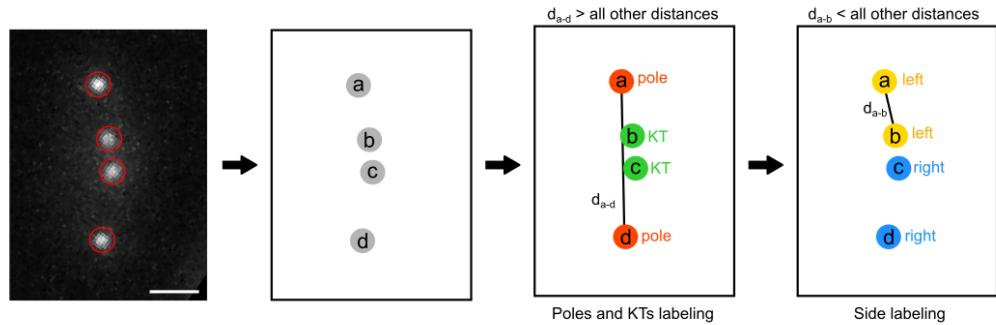


Figure 2.9: Algorithme de tracking pour un chromosome.

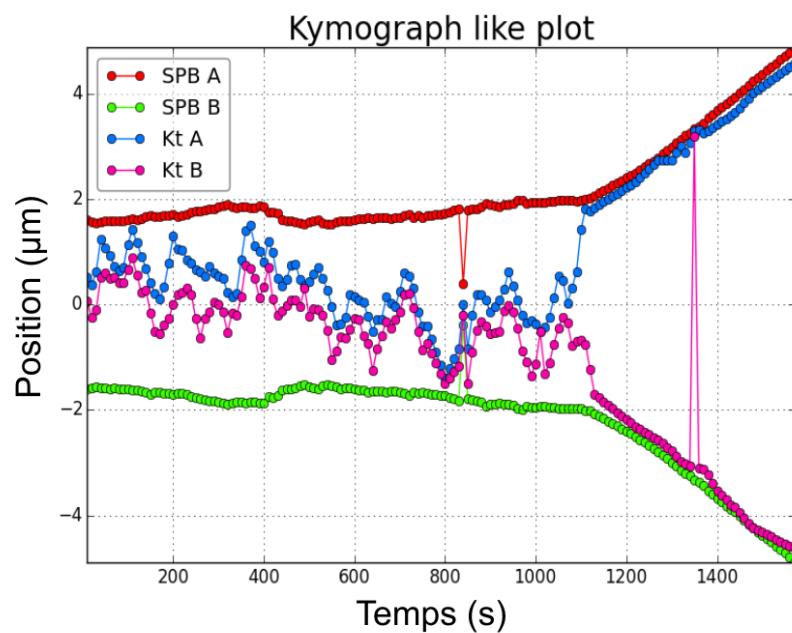


Figure 2.10: Reconstruction de la trajectoire du chromosome II et de ses deux pôles.

Interface de correction manuelle des trajectoires

Afin de pouvoir facilement corriger les trajectoires des chromosomes contenant des erreurs qu'il aurait été dommage d'écartier de l'analyse, il a été développé une interface graphique de correction manuelle. Cette interface écrite en Python est basée sur la bibliothèque `pyqtgraph`.³ Son code est librement disponible.⁴

L'interface permet de naviguer de manière intuitive dans la trajectoire à l'aide d'un système de zoom dynamique (Figure 2.11). Il est possible de visualiser en deux dimensions n'importe quelle information contenue dans la trajectoire telles que le temps, la position en x , y et z (si disponible), la taille et l'intensité des blobs, etc. Elle permet aussi d'annoter les trajectoires en leur donnant une note comprise entre un et trois décrivant la qualité de la trajectoire. Enfin il est possible de spécifier le début de l'anaphase (Figure 2.11A) afin de pouvoir faciliter l'analyse automatique des différentes phases de la mitose ultérieurement.

Cependant l'utilité majeure de l'interface graphique est de pouvoir modifier les erreurs de tracking (Figure 2.11B). Ainsi il est possible de sélectionner un ou plusieurs blobs en même temps afin de les supprimer. On peut aussi sélectionner deux trajectoires afin de les raccorder, de les fusionner ou bien de les séparer.

2.2.1.3 Résumé du workflow de reconstruction des trajectoires

Voici un résumé de l'ensemble des étapes menant à la reconstruction de la trajectoire des chromosomes (Figure 2.12). En entrée, on possède un film issu de la vidéo-microscopie à fluorescence contenant la dynamique des chromosomes et des pôles du fuseau mitotique durant la mitose. En sortie, on obtient la trajectoire de chacun des objets qui contient les positions ainsi que les propriétés géométriques des blobs pour chaque pas de temps.

La constitution d'une base de donnée de trajectoires contenant différentes souches cellulaires permet par la suite de comparer les différents groupes de trajectoires afin d'en extraire leurs principales propriétés biophysiques.

³www.pyqtgraph.org

⁴<http://git.io/vCNxh>

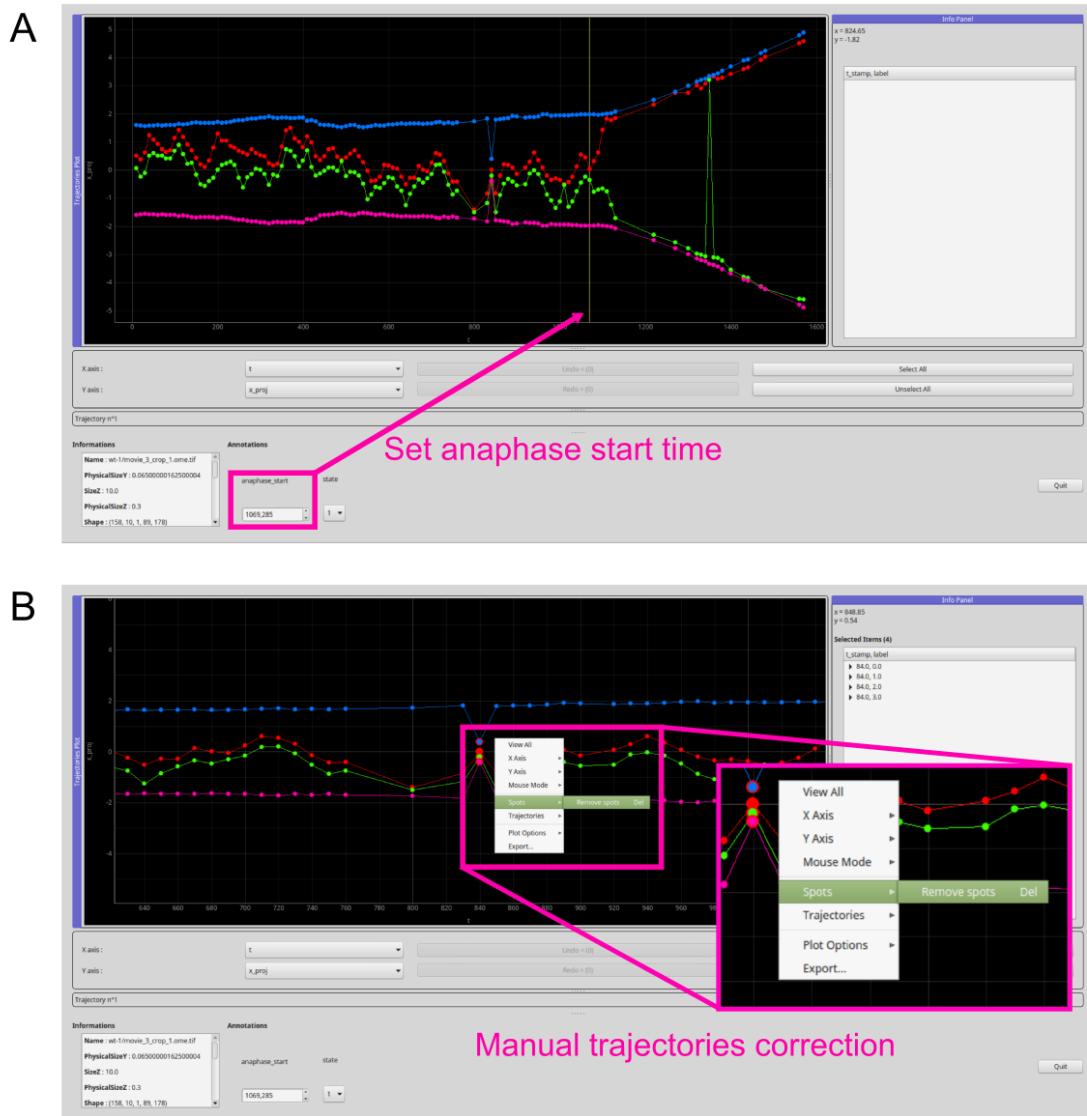


Figure 2.11: Interface graphique de correction manuelle des trajectoires. **A.** Le début de l'anaphase peut être modifié manuellement. **B.** Chaque trajectoire peut être modifiée à l'aide d'une interface simple et intuitive.

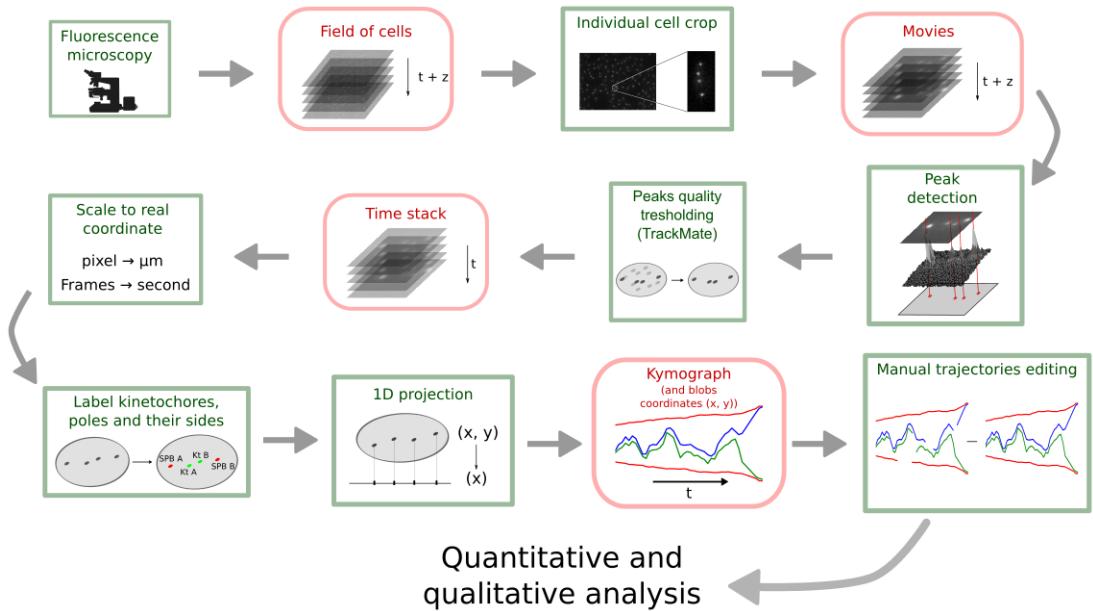


Figure 2.12: Workflow de reconstruction des trajectoires. Deux étapes nécessitent une intervention manuelle. Suite à la détection de blobs (peaks) et après la reconstruction automatique des trajectoires.

2.2.2 L'état de cohérence du mouvement des kinétochères frères

En plus des propriétés oscillatoires telles que l'amplitude ou la période des mouvements (voir Section 2.1 pour les résultats de cette analyse), il est aussi possible d'analyser la cohérence du mouvement des kinétochères (Armond et al. (2015)).

On définit la cohérence d'un mouvement pour deux kinétochères frères comme étant l'état de synchronisation du mouvement de chaque kinétochore en fonction de son kinétochore frère. Par exemple, si un kinétochore a un mouvement poleward (P), le mouvement du chromosome est cohérent si son kinétochore frère à un mouvement anti-poleward (AP) (Figure 2.13).

La méthode (Armond et al., 2015) consiste à assigner une direction (poleward (P), anti-poleward (AP) ou inconnu (N)) à chaque kinétochore indépendamment les uns des autres. La direction pour un pas de temps est déterminée en regardant le signe du mouvement à ce temps ainsi que le signe des mouvements autour de ce pas de temps dans une fenêtre de taille w . On assigne ainsi pour chaque pas de temps un score qui selon sa valeur classe le pas de temps en P, AP ou N (Figure 2.13).

$$S_i = \frac{n_p - n_{AP}}{2w - 1}$$

Où n_p et n_{AP} sont le nombre de pas de temps contenant un état poleward et anti-poleward dans la fenêtre de temps de taille w . L'état est déterminé en regardant le signe

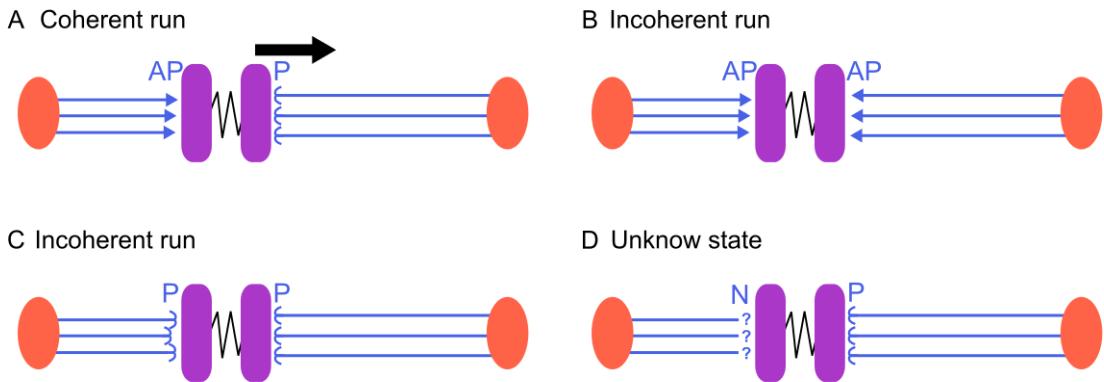


Figure 2.13: Schéma de mouvement cohérent et incohérent des kinétochores frères. **A.** Les deux kinétochores frères sont dans des états poleward et anti-poleward, le mouvement est cohérent. **B** et **C.** Les deux kinétochores frères sont dans le même état poleward ou anti-poleward, le mouvement est incohérent. **D.** Dans certains cas il est impossible de déterminer précisément l'état de cohérence d'un chromosome.

du mouvement en fonction de la position du pôle. Les pas de temps avec $S_i < -S^*$ sont assignés comme P. Les pas de temps avec $S_i > S^*$ sont assignés comme AP. Les paramètres ont été fixés manuellement avec $S^* = 0.15$ et $w = 10$ (avec $dt = 100ms$). Si $-S^* < S_i < S^*$ alors le pas de temps est considéré comme n'ayant pas de direction (N).

Bien que cette méthode soit grandement dépendante de S^* , elle reste efficace pour pouvoir comparer des trajectoires provenant de différentes conditions.

Dans une cellule sauvage, on observe que le kinetochore est le plus souvent dans l'état opposé à son kinetochore frère bien qu'il existe de courtes périodes de temps où les deux kinétochores sont dans un état incohérent (Figure 2.14, voir le mouvement entre 220 s et 230 s).

Si l'on compare les états de cohérence de plusieurs cellules dans différentes conditions (Figure 2.15) on observe que les kinétochores des mutants kinésine-8 ($klp6\Delta$, $klp5\Delta$ et $klp56\Delta$) passent plus de temps dans un état incohérent que dans les cellules sauvages. Plus précisément, l'état incohérent AP-AP semble privilégié alors que l'état P-P semble être le même que dans les cellules sauvages.

Si l'on suppose que le mouvement P implique que les microtubules associés soient en majorité dans un état de dépolymérisation et que le mouvement AP implique que les microtubules associés soient en majorité dans un état de polymérisation (Armond et al., 2015) alors cette observation pourrait indiquer que la kinésine-8 participe activement à la synchronisation du mouvement des kinétochores frères.

La distance inter-kinétochore peut être un bon moyen pour quantifier la tension exercée sur les kinétochores par les microtubules. De cette façon, en observant la distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions, on voit que de

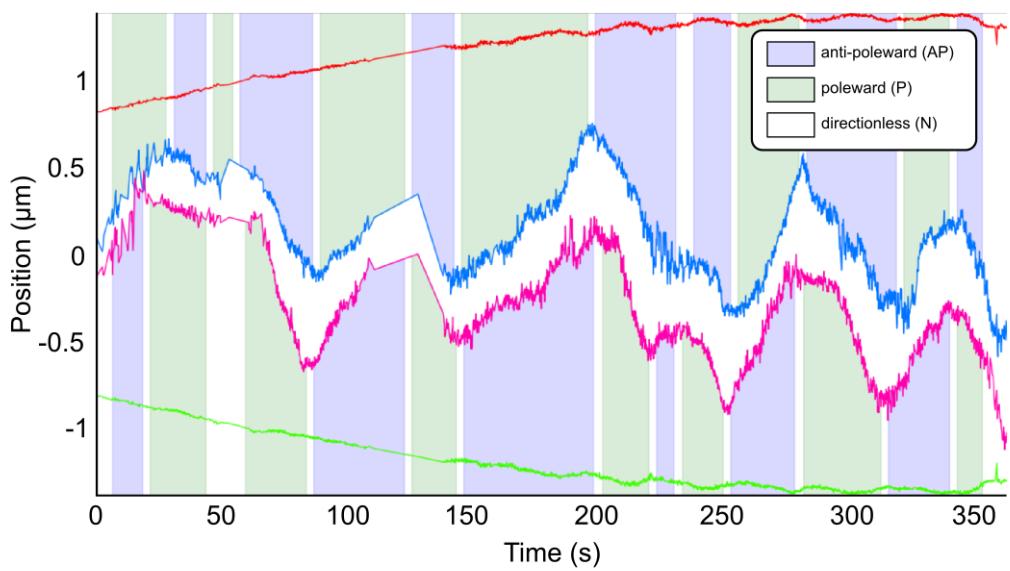


Figure 2.14: Direction des kinétochores frères en métaphase. Trajectoires des pôles (rouge et vert) et des kinétochores frères (bleu et rose) en métaphase dans une cellule sauvage. Le pas de temps de l'acquisition est de 100ms.

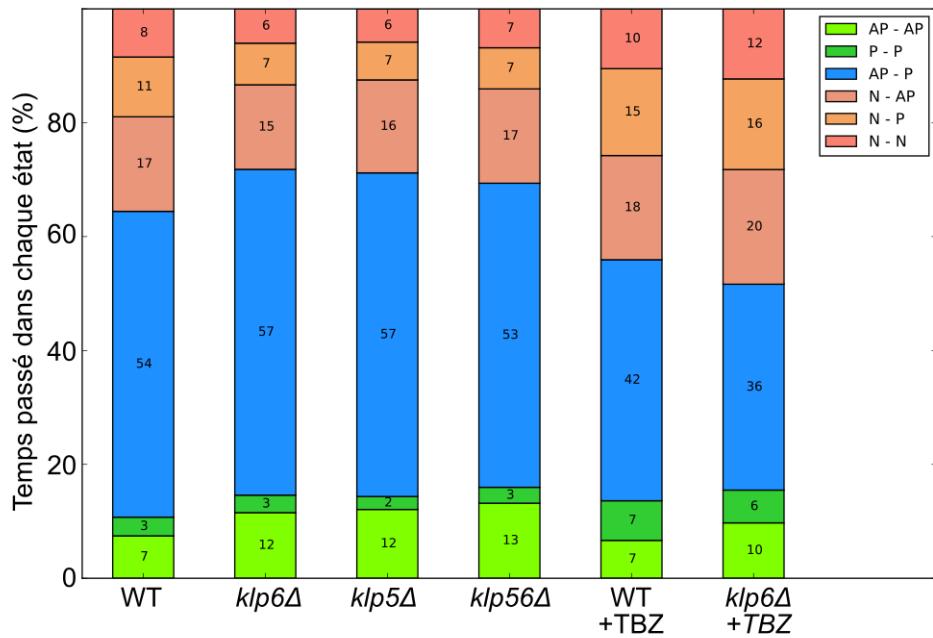


Figure 2.15: Temps passé dans les différents états de cohérence dans diverses conditions. WT désigne une cellule sauvage. *klp6Δ*, *klp5Δ* et *klp56Δ* désignent différents mutants de la kinésine-8 qui possèdent tous le même phénotype (voir Section 2.1 pour plus de détails). TBZ désigne une drogue, le thiabendazole qui inhibe les oscillations des chromosomes en métaphase. Le nombre de cellules utilisées pour cette analyse est $n = 24$ pour WT, $n = 18$ pour *klp6Δ*, $n = 12$ pour *klp5Δ*, $n = 26$ pour *klp56Δ*, $n = 19$ pour WT+TBZ, $n = 14$ pour *klp6Δ*+TBZ.

manière assez subtile la distribution des distances pour un état cohérent (AP-P) est en moyenne de 400 nm dans toutes les conditions. Elle semble par ailleurs très légèrement supérieure pour l'état incohérent P-P et très légèrement inférieure pour l'état incohérent AP-AP. Bien que ces résultats ne soit pas significatifs, ils pourraient supporter l'idée qu'un mouvement AP implique une force de poussée tandis qu'un mouvement P implique une force de traction sur le kinétochore.

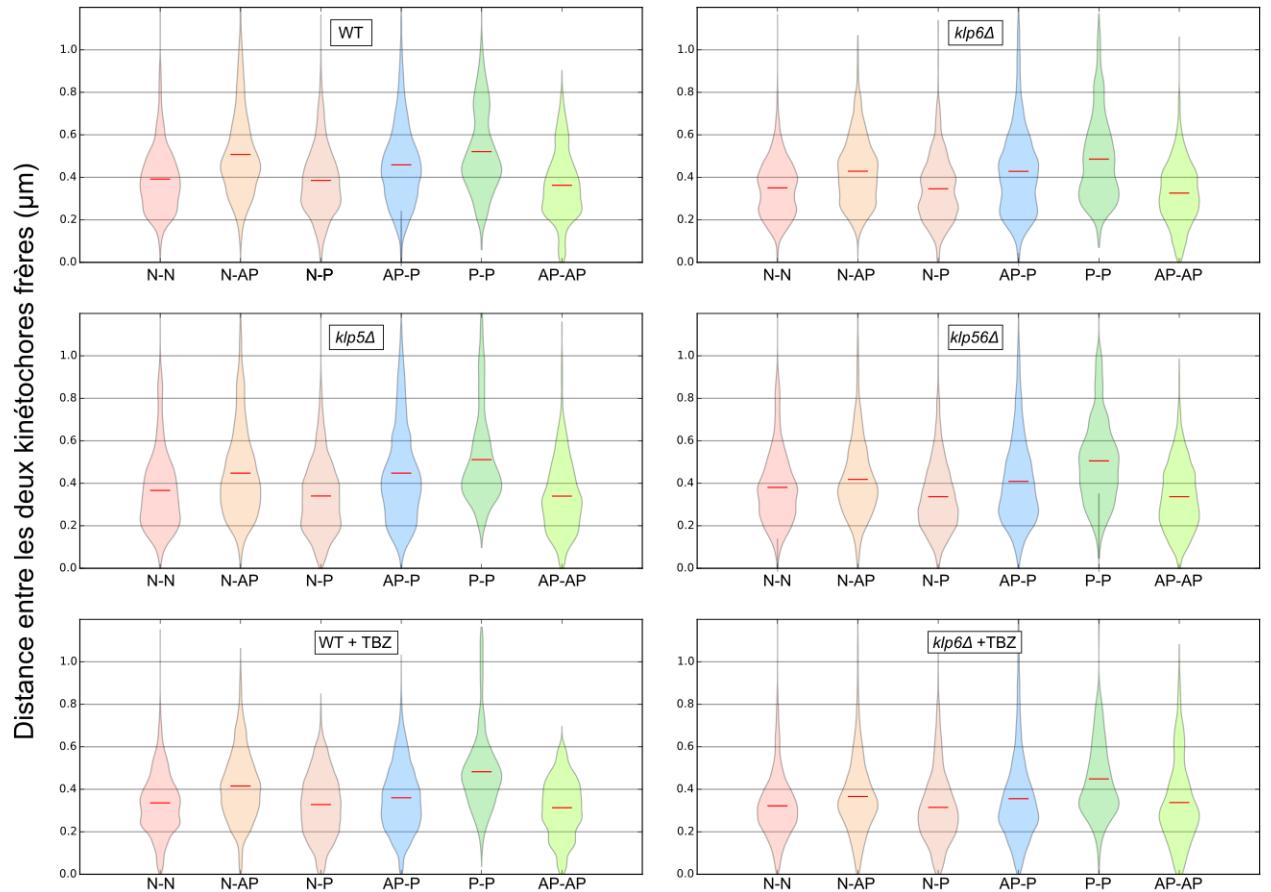


Figure 2.16: Distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions. La barre rouge des violin plots désigne la moyenne. WT désigne une cellule sauvage. *klp6Δ*, *klp5Δ* et *klp56Δ* désigne différents mutants de la kinésine-8 qui possède tous le même phénotype (voir Section 2.1 pour plus de détails). TBZ désigne une drogue, le thiabendazole qui inhibe les oscillations des chromosomes en métaphase. Le nombre de cellule utilisées pour cette analyse est $n = 24$ pour WT, $n = 18$ pour *klp6Δ*, $n = 12$ pour *klp5Δ*, $n = 26$ pour *klp56Δ*, $n = 19$ pour WT+TBZ, $n = 14$ pour *klp6Δ+TBZ*.

Cette dernière observation nécessite d'être confirmée car la mesure de la distance inter-kinétochore dans ce système pourrait comporter un biais important. En effet, le mutant Cen2-GFP possède une sonde fluorescente au niveau de la partie péri-centromérique de la chromatide, donc proche mais pas tout à fait au même endroit que le kinétochore. La distance entre les deux positions a été estimée à 125 nm (Gay et al., 2012) ce qui est bien plus que la différence observée. De plus la sonde ne se situe pas dans l'axe des deux

kinétochore frères ce qui signifie qu'une traction ou une poussée sur cet axe pourrait bien être invisible en mesurant la distance entre les sonde Cen2-GFP.

Pour finir, on notera quand même que la légère différence de distance inter-kinétochore pour les états AP-AP et P-P est retrouvée dans toutes les conditions observées et vont à chaque fois dans le même sens. Cela constitue tout de même une forte indication que la distance inter-kinétochore varie de manière significative. Le système Cen2-GFP ne serait simplement pas assez précis pour capter l'amplitude totale de cette variation.

L'analyse de l'état de cohérence des kinétochores est une observation dans des fenêtres de temps relativement grande de l'ordre de 10 s. Il est possible d'analyser les trajectoires dans des fenêtre de temps réduite d'un facteur 10 à 100 afin de capter les propriétés biophysique sous jacentes qui contrôlent le mouvement des kinétochores au niveau moléculaire.

2.2.3 Analyse du mouvement par « Mean Square Displacement »

2.2.3.1 La MSD, un outil pour accéder aux différents phénomènes gouvernant un mouvement

Les mouvements observés au niveau subcellulaire peuvent être dirigés par des processus différents qu'on peut diviser en trois familles :

- un mouvement purement diffusif (aussi appelé mouvement brownien) gouverné par l'ensemble des chocs de petites particules sur une particule plus grosse. Il en résulte un mouvement aléatoire dans toutes les dimensions de l'espace.
- un mouvement diffusif confiné qui est restreint dans l'espace, par exemple à cause d'une paroi cellulaire ou subcellulaire contraignant le mouvement d'une protéine.
- un mouvement dirigé qui est principalement gouverné par une force s'appliquant sur l'objet le mettant ainsi en mouvement dans une direction particulière.

Dans la réalité les mouvements observés sont souvent dirigés par un mélange de ces trois processus.

L'outil communément utilisé pour l'étude de ces processus est la mesure du « Mean Square Displacement » (MSD) qui représente l'étendue spatiale explorée (caractérisé par une aire dans le cas d'un mouvement en deux dimensions) en fonction de différents intervalles de temps τ .

Si on suppose ces processus stationnaires, il est possible de les modéliser tel que :

- pour un mouvement diffusif (mouvement brownien) :

$$\text{MSD}(\tau) = 2dD\tau$$

Où d est le nombre de dimensions et D le coefficient de diffusion.

- pour un mouvement confiné et diffusif :

$$\text{MSD}(\tau) = R_c^2(1 - e^{-2dD\tau/R_c})$$

Où R_c est le rayon dans lequel la particule est confinée, d est le nombre de dimensions et D le coefficient de diffusion.

- pour un mouvement dirigé :

$$\text{MSD}(\tau) = v^2\tau^2$$

Où v est la vitesse de la particule.

On notera par ailleurs qu'il est aussi possible de modéliser une MSD plus simplement en généralisant simplement le modèle du mouvement diffusif :

$$\text{MSD}(\tau) = 2dD\tau^\alpha$$

Où α désigne une constante. Si $\alpha = 1$, on observe un mouvement diffusif, si $\alpha > 1$, il s'agit d'un phénomène de super-diffusion tandis que pour $\alpha < 1$, le phénomène est appelé sous-diffusion.

La mesure de la MSD pour une différence de temps Δt est calculée comme la distance au carré entre la position de l'objet r_i au temps t et sa position au temps $t + \Delta t$ moyenné sur tout les temps successifs t :

$$\text{MSD}(\Delta t) = \langle (r_i(t) - r_i(t + \Delta t))^2 \rangle$$

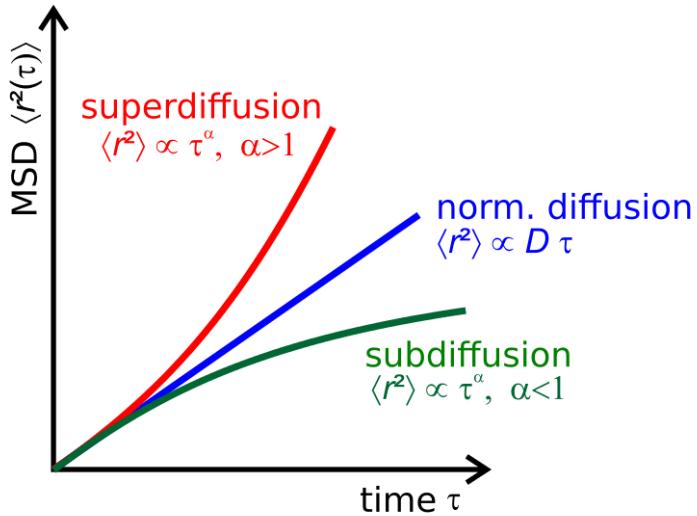


Figure 2.17: Exemple de MSD pour trois types de diffusion théoriques. Adapté de https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMsd_anomalous_diffusion.svg

Par exemple, on peut simuler un mouvement brownien et un mouvement dirigé en deux dimensions (Figure 2.18A,B). On observe que dans le cas d'un mouvement brownien, l'aire explorée (la MSD) est beaucoup plus petite pour un même délai que dans le cas d'un mouvement dirigé.

En fittant des mesures de mouvement de particules avec les équations décrites précédemment on peut trouver le mouvement majoritaire qui gouverne le processus (diffusif, dirigé ou confiné) ainsi qu'accéder aux paramètres physiques gouvernant ces phénomènes tels que le coefficient de diffusion D , la vitesse de la particule v ou encore le volume de confinement R_C .

Cette approche est appelée modélisation basée sur les données (« data-driven modeling » en anglais). Toute la difficulté est de trouver la bonne technique pour remonter aux équations à partir des données. Un article publiée par Monnier et al. (Monnier et al., 2012) propose une approche basée sur les statistiques bayésiennes afin de prédire pour différents types de mouvement le processus à l'origine ainsi que les paramètres associés.

2.2.3.2 Mesure de la MSD appliquée au mouvement de Cen2-GFP

La MSD a été mesurée pour chaque trajectoire du chromosome 2 dans différentes conditions avec un pas de temps faible ($dt = 100ms$) afin de pouvoir « capter » un éventail large de phénomènes. Les différentes conditions utilisées sont des cellules sauvages et délétées pour la kinésine-8 ($klp6\Delta$, $klp5\Delta$ et $klp56\Delta$) ainsi que des cellules auxquelles il a été ajouté une drogue appelé le thiabendazole (TBZ) qui est connu pour stabiliser les microtubules à de faibles doses ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$) (Vasquez et al., 1997).

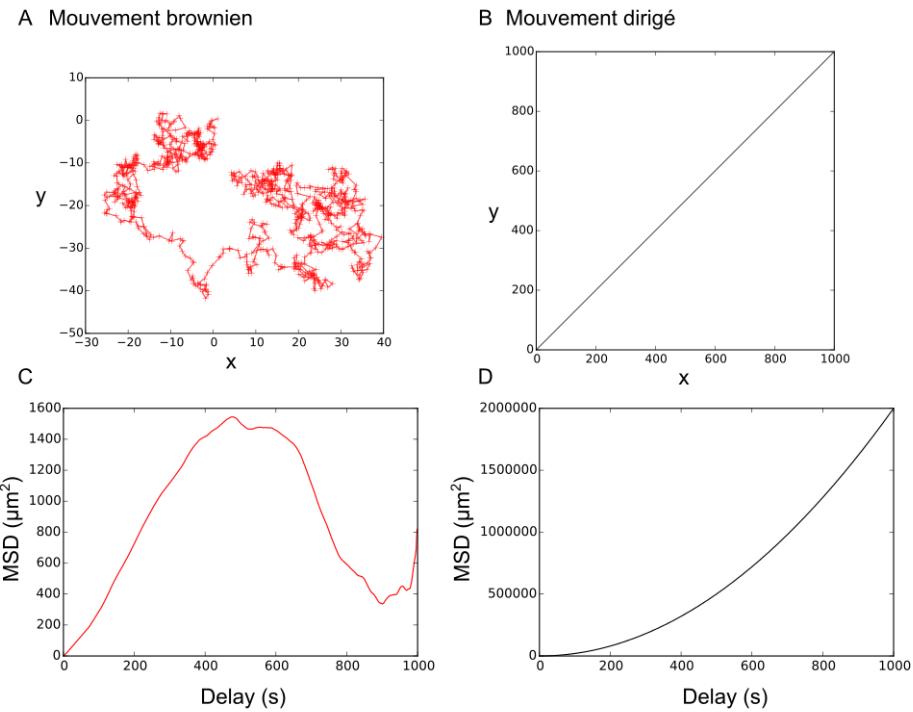


Figure 2.18: Exemple de MSD pour un mouvement dirigé et un mouvement brownien simulé. **A** et **B**. Évolution des positions d'une particule en deux dimensions dans le cas d'un mouvement respectivement brownien et dirigé simulé. **C** et **D**. MSD correspondant aux mouvements en **A** et **B**.

La première chose que l'on remarque à l'observation des MSD (Figure 2.19 et Figure 2.20 pour une visualisation en log-log) est le comportement stéréotypé très changeant de chacune des courbes sous différentes conditions.

L'une des premières caractérisation qu'il est possible de faire est de comparer les différentes pentes contenues dans chacune des MSD.

Chacune des MSDs contient trois pentes et un comportement final caractéristique. Les deux premières pentes (orange et verte sur la Figure 2.21) jusqu'à 2 s semblent être indépendantes des mutants ou de la drogue utilisés. Au temps plus longs, on observe d'abord une pente (en bleu sur la Figure 2.21) jusqu'à 40 s où les mutants et la drogue ont un effet important. La pente chez la souche sauvage vaut 1 alors que chez les mutants kinésine-8, elle est plus grande et vaut à peu près 1.25. Le TBZ a pour effet de diminuer la pente chez la souche sauvage et aussi chez le mutant de la kinésine-8 (Figure 2.21).

Enfin la souche sauvage présente un plateau au-delà de 40 s alors que celui-ci est absent chez les mutants kinésine-8 ou en présence de TBZ.

Bien qu'il soit difficile d'interpréter ces observations d'un point de vue biophysique, il est déjà possible de dire que la kinésine-8 et la dynamique des microtubules ont un effet sur le mouvement des chromosomes visible par la MSD.

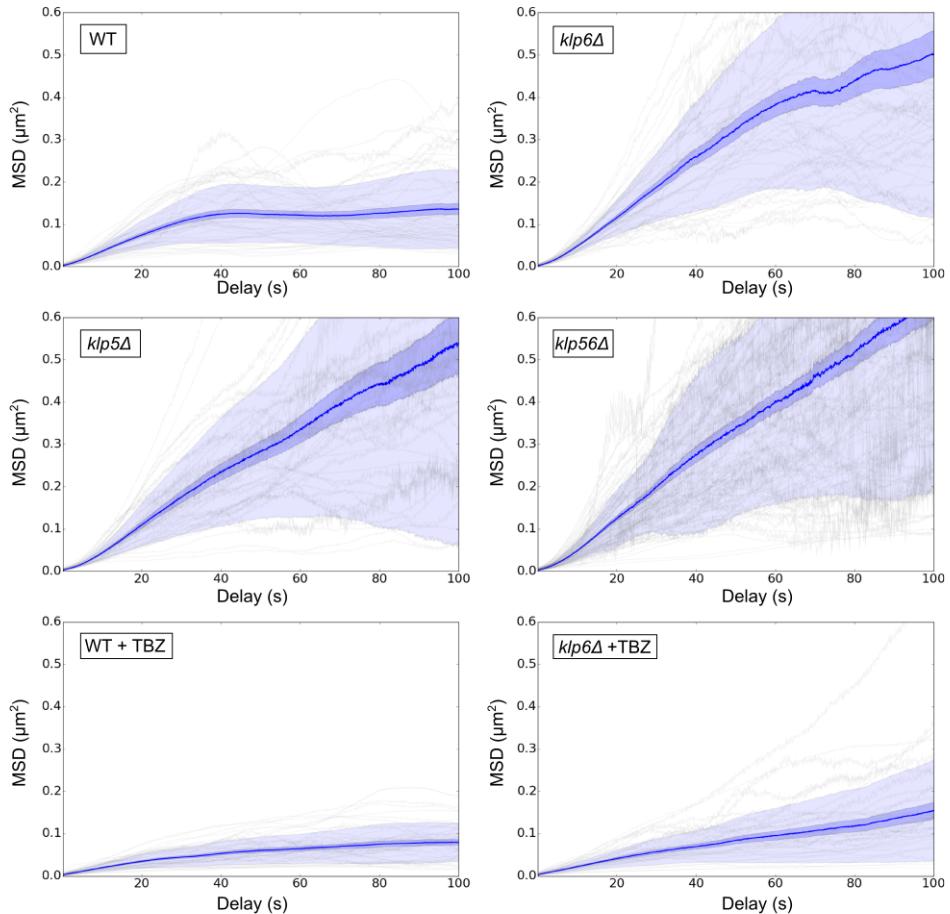


Figure 2.19: MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. La ligne bleu foncé représente la MSD moyenne pondérée par le nombre de pas de temps pour un délai donné. L'erreur en bleu clair représente l'erreur standard de la moyenne tandis que l'erreur en bleu très clair représente la déviation standard. Les MSD en gris correspondent aux MSD individuelles de chacune des trajectoires. Le nombre de trajectoires utilisé pour cette analyse est $n = 26$ pour WT, $n = 25$ pour $klp6\Delta$, $n = 22$ pour $klp5\Delta$, $n = 51$ pour $klp56\Delta$, $n = 23$ pour WT+TBZ, $n = 19$ pour $klp6\Delta+TBZ$.

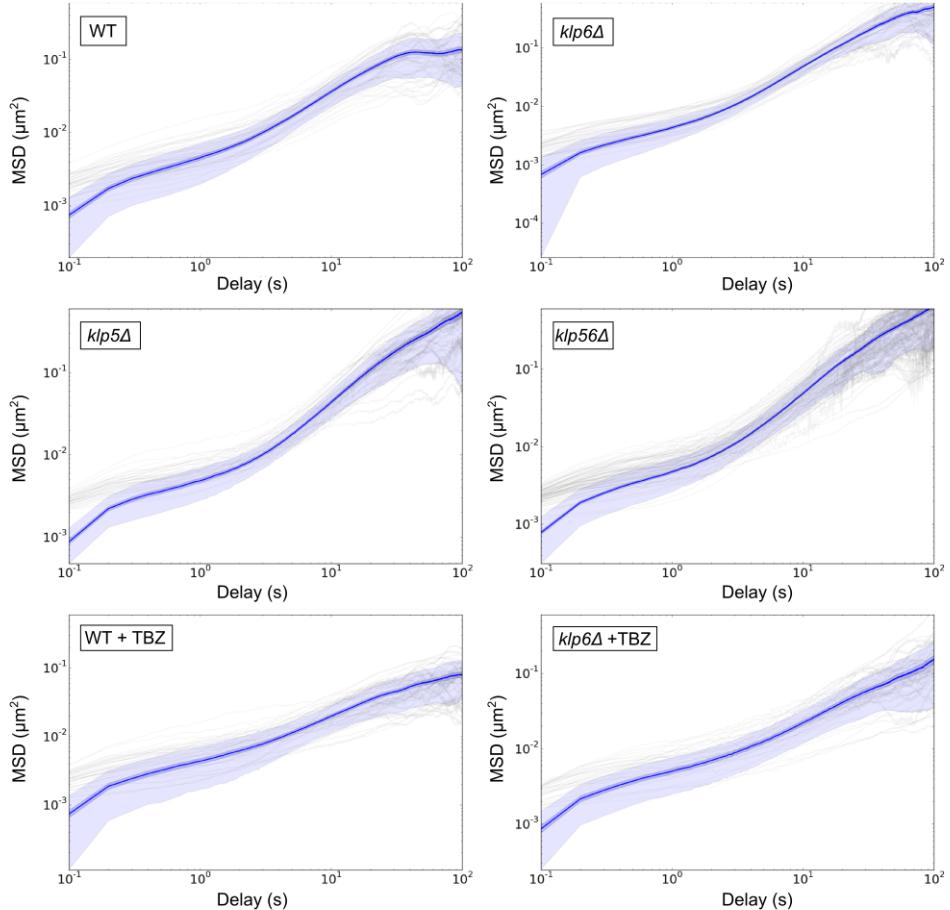


Figure 2.20: MSD en log-log pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. L'erreur en bleu clair représente l'erreur standard de la moyenne tandis que l'erreur en bleu très clair représente la déviation standard. Les MSD en gris correspondent aux MSD individuelles de chacune des trajectoires. Le nombre de trajectoires utilisées pour cette analyse est $n = 26$ pour WT, $n = 25$ pour $klp6\Delta$, $n = 22$ pour $klp5\Delta$, $n = 51$ pour $klp56\Delta$, $n = 23$ pour WT+TBZ, $n = 19$ pour $klp6\Delta$ +TBZ.

Les deux premières pentes au temps court pourrait être un effet de convolution de plusieurs phénomènes comme le bruit stochastique inhérent au système observé ainsi que le mouvement diffus de Cen2-GFP par rapport au kinétochore et à l'axe kinétochore-kinétochore où la tension est exercé. Pour confirmer cette hypothèse il faudrait comparer ces observations avec des MSDs de trajectoires d'une protéine du kinétochore comme Ndc80-GFP par exemple.

L'augmentation de la pente aux temps plus longs (de 2 s à 40 s) chez les mutants kinésine-8 pourrait être la signature des amplitudes d'oscillations plus importantes (Mary et al., 2015). Cette hypothèse semble être confirmé par la diminution de la pente observée chez les cellules en présence de TBZ.

Enfin il est plus surprenant d'observer que seul les cellules sauvages possèdent un plateau au-delà de 40 s alors que les trajectoires chez les cellules en présence de TBZ ne contiennent presque pas d'oscillations.

L'étape suivant ces premières observations serait d'abord de fitter ces courbes avec des modèles théoriques caractérisant ces mouvements (voir en Section 2.2.3.1). Cette étape peut être complexe en parti à cause de la combinaison des différents modèles qu'il est possible d'utiliser. Une approche possible pour cette analyse est l'utilisation des statistiques bayésiennes qui semble particulièrement adaptée dans ce cas là (Monnier et al., 2012).

Il peut aussi être utile de comparer ces données ainsi que les modèles théoriques avec des trajectoires simulées *in silico* et d'observer si les même effets au temps court (les deux premières pentes) sont présentes afin de comprendre la participation de la sonde Cen2-GFP dans la mesure de MSD.

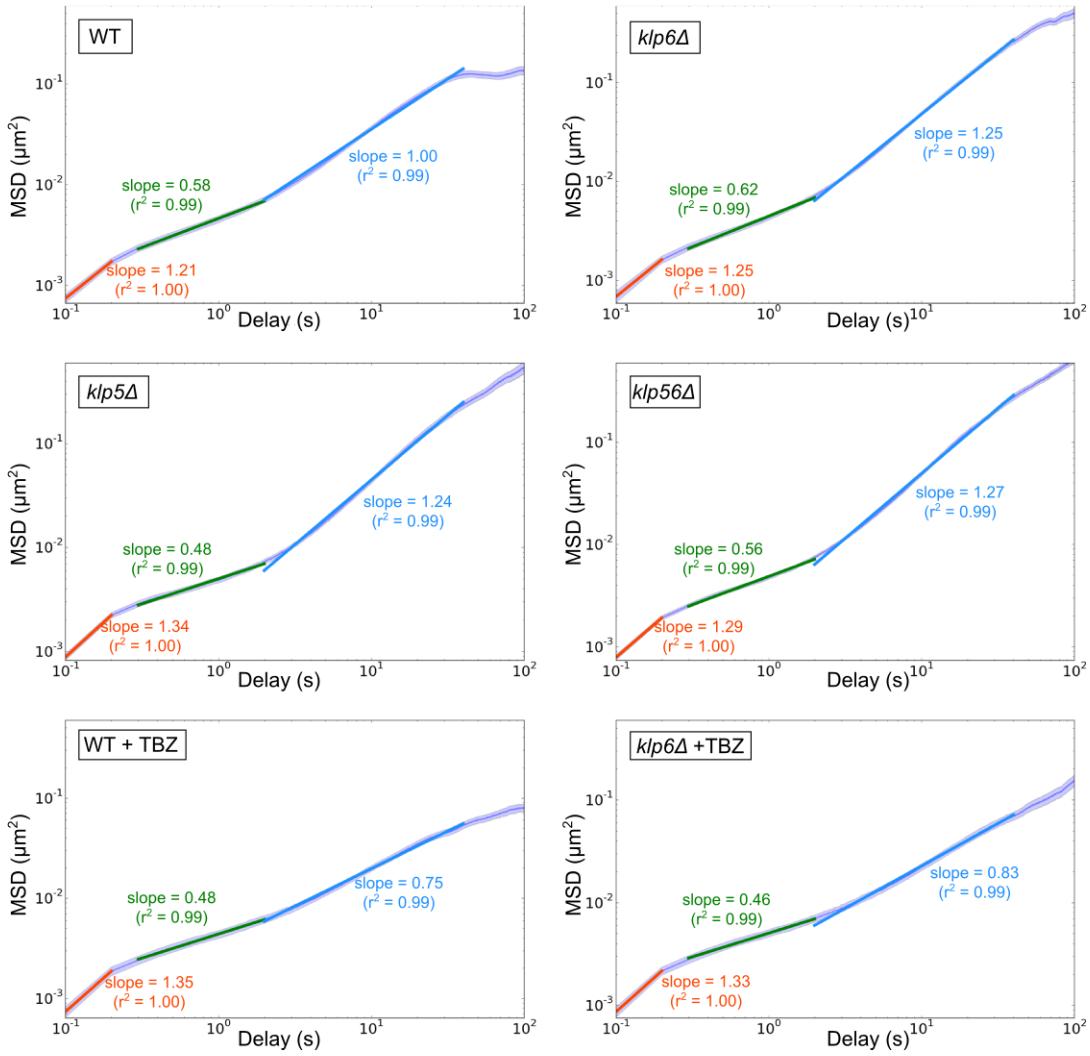


Figure 2.21: Régression linéaire sur des MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. La régression linéaire a été faite en utilisant la fonction `scipy.stats.linregress` de la bibliothèque python `scipy`. Les temps choisis pour les trois différentes régressions sont : de 0.1 s à 0.3 s, de 0.3 s à 2 s et de 2 s à 40 s.

2.3 Modélisation bio-mécanique de la ségrégation des chromosomes

La modélisation *in silico* des trajectoires des chromosomes en mitose permet de mieux comprendre quels sont les mécanismes sous-jacents responsables de la régulation de ces mouvements. L'approche « modèles de connaissance », qui s'inspire de la mécanique du point, permet d'établir des hypothèses sur les mécanismes de congression des chromosomes en métaphase. Enfin d'autre hypothèses sont aussi envisagées afin de décrire les oscillations du mouvement des chromosomes observées *in vivo*.

2.3.1 `kt_simul` : l'implémentation numérique du modèle de ségrégation des chromosomes

L'implémentation numérique du modèle (appelée `kt_simul`) précédemment développé par Tournier et al. (Gay et al., 2012) est disponible en libre accès sous licence open-source à cette adresse : https://github.com/bnoi/kt_simul. Le code source est basé sur le langage de programmation Python ainsi que l'ensemble des bibliothèques scientifiques associées (« Scipy »; Oliphant (2007)).

Dans le but de rendre `kt_simul` plus facilement utilisable et modifiable, une partie du travail a consisté à refactoriser le code pré-existant. Il est ainsi possible d'exécuter une simulation en une dizaine de ligne de codes. Différentes options sont disponibles pour récupérer ou visualiser les données générées par la simulation. Pour un exemple d'utilisation voir l'annexe en Section A.1.

L'exécution d'un grand nombre de simulations peut prendre du temps, c'est pour cela que des fonctions permettant la répartition de différentes simulations sur différents coeurs de la machine qui les exécute ont été rajoutées (Figure 2.22). La parallélisation permet une réduction drastique des temps de calcul sans avoir à requérir à un puissant cluster, souvent cher et difficile d'accès. Ainsi une station de travail classique, équipée de 16 coeurs Intel Xeon E5-2650 cadencé à 2GHz, est capable d'exécuter plus de 2000 simulations standards en une heure tandis que la version non parallélisée en exécute seulement 200.

`kt_simul` permet donc de modifier le modèle facilement. Il a été utilisé pour tester plusieurs hypothèses afin de mieux comprendre l'alignement et le mouvement des chromosomes.

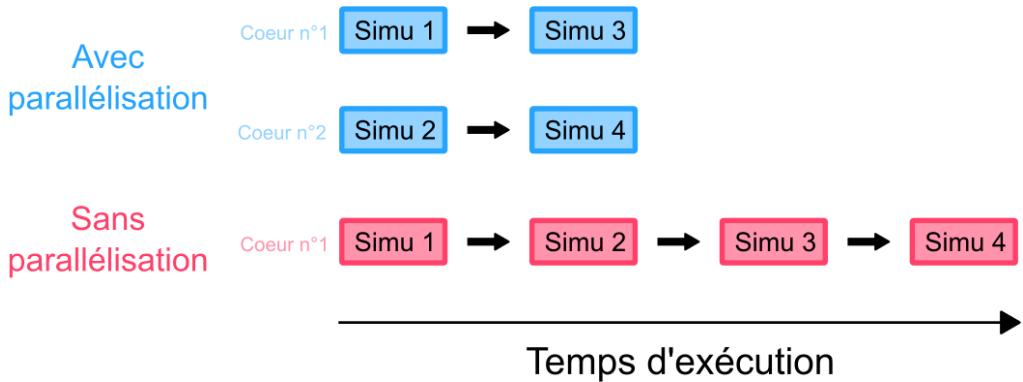


Figure 2.22: Schéma décrivant le principe de la parallélisation en informatique. Différence de vitesse d'exécution théorique entre une implémentation parallélisée et une implémentation séquentielle. Un algorithme parallélisé (en bleu) utilise les différents cœurs de la machine pour exécuter plusieurs simulations en même temps. Une machine possédant deux cœurs exécute en théorie les quatre simulations deux fois plus vite qu'un algorithme non parallélisé (en rose).

2.3.2 Un modèle de congression alternatif

L'étude publiée dans le cadre de ce travail de thèse (Mary et al., 2015) a montré que la kinésine-8 pouvait agir comme un régulateur des forces appliquées sur les kinétochores en fonction de la position le long du fuseau mitotique.

Il a par ailleurs été montré *in silico* qu'une force dépendante de la distance au pôle sur le kinétochore pouvait reproduire l'alignement des chromosomes *in vivo* (Figure 2.23 et Figure 2.24) en adaptant un modèle existant de la ségrégation des chromosomes (Gay et al., 2012). Cette force dépendante de la longueur est gouvernée par un seul paramètre L_{dep} qui caractérise l'amplitude de la dépendance en longueur de cette force. Elle a été optimisée afin de reproduire les distributions d'alignement *in vivo* (pour le détail de l'implémentation, se référer aux méthodes de l'article en Section 2.1, (Mary et al., 2015)).

L'hypothèse 1, présentée dans ce travail (Section 2.1), est principalement basée sur des observations *in vivo* et *in vitro* montrant que la kinésine-8 s'accumule de manière plus importante à l'extrémité plus du microtubule (Tischer et al., 2009; Varga et al., 2006, 2009). Ce gradient de concentration de kinésine-8 viendrait alors modifier la dynamique du microtubule kinétochorien. Si les études effectuées dans différents organismes (cellule humaines, levure à fission et levure à bourgeon) ne s'accordent pas sur le paramètre exact de la dynamique des microtubules qui est modifié par la kinésine-8, toutes s'accordent à dire que la kinésine-8 possède une activité dépolymérisatrice qui régule la longueur des microtubules (Messin and Millar, 2014; Walczak et al., 2013).

La force dépendante de la longueur, décrite par l'hypothèse 1, peut donc s'expliquer par le fait que si un microtubule possède une densité plus élevée de kinésine-8 à une

Hypothesis 1 : Length-dependent pulling force

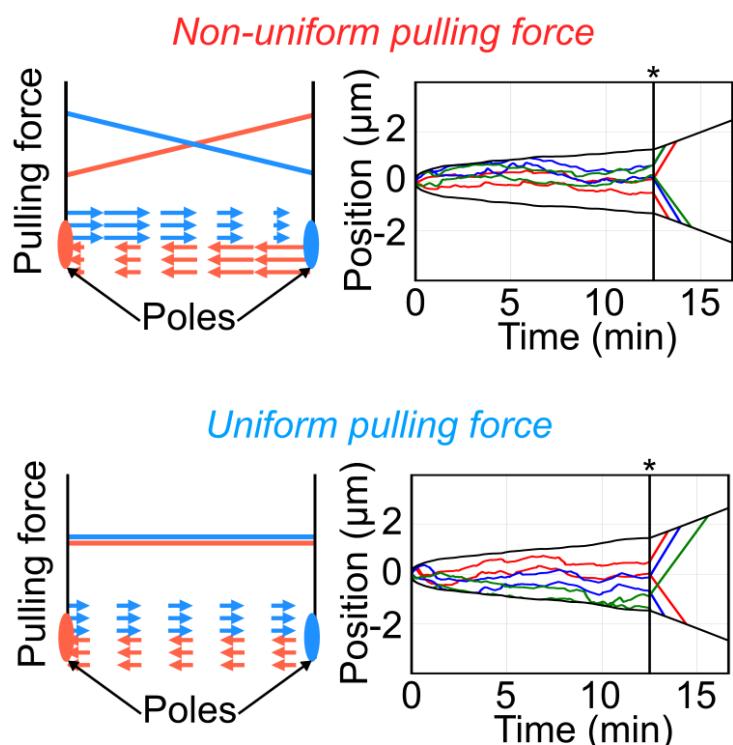


Figure 2.23: Schémas et exemple de trajectoire *in silico* du mécanisme d'alignement avec et sans force dépendante de la longueur. Les flèches correspondent aux forces appliquée sur les kinétochores en fonction de leur position le long du fuseau et leurs tailles illustrent la magnitude des forces.

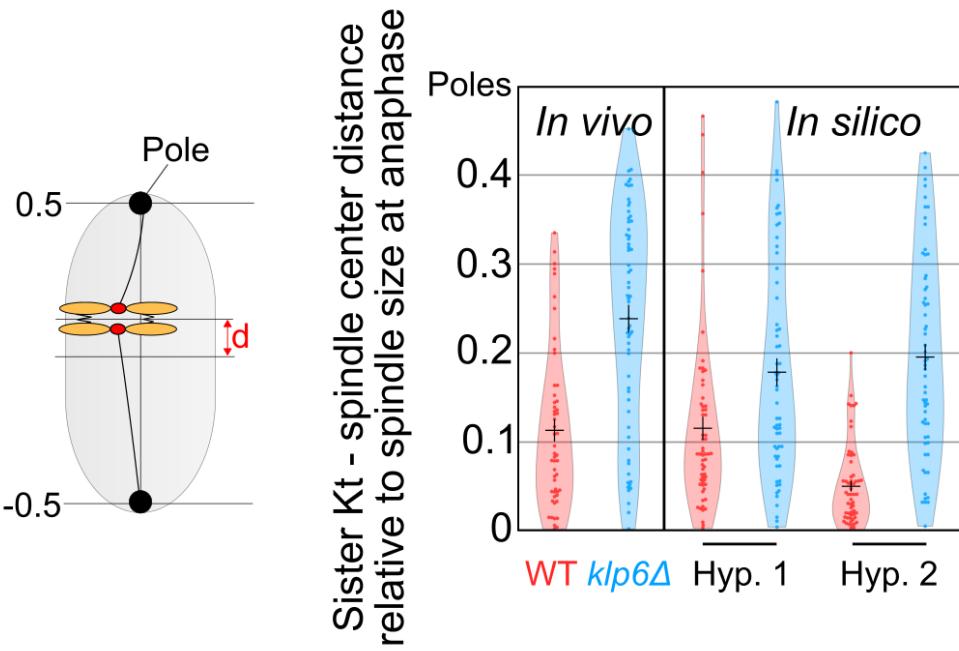


Figure 2.24: Distribution de l’alignement relatif des chromosomes en anaphase *in vivo* (dans les cellules WT, n=52 et *klp6Δ*, n=63) et *in silico* pour l’hypothèse 1 (avec, n=60 ou sans la force dépendante de la longueur, n=60) et *in silico* pour l’hypothèse 2 (avec, n=60 ou sans la force dépendante de la longueur, n=60). Une distance proche de 0 signifie que le chromosome est positionnée au milieu du fuseau mitotique.

extrémité, il produira une force de traction plus élevée sur le kinétochore. Bien que cette hypothèse reproduise de manière fidèle l’alignement ainsi que l’absence de chromosomes retardataires en anaphase (Figure 2.24 et aussi Figure 7 de l’article en Section 2.1), le mécanisme proposé est encore très phénoménologique et le lien entre force de traction et kinésine-8 reste largement hypothétique.

La flexibilité de l’implémentation du modèle `kt_simul` permet de proposer une hypothèse alternative moins phénoménologique.

L’hypothèse 2 est basée sur l’observation faite que la kinésine-8 peut contrôler la taille des microtubules (Varga et al., 2006). On peut donc supposer que la distribution des extrémités plus des microtubules au sein du fuseau mitotique n’est pas uniforme mais suit une distribution de type « distribution en cloche » (possédant un paramètre de position et un paramètre d’échelle) comme une distribution gaussienne par exemple.

L’hypothèse 2 est donc construite sur l’idée que la probabilité d’attachement va dépendre de la densité d’extrémités plus des microtubules le long du fuseau. Donc la probabilité d’attachement devrait varier en fonction de cette distribution de taille des microtubules.

L’implémentation est basée sur la modification de la probabilité d’attachement des microtubules aux kinétochères. Dans le modèle initial (Gay et al., 2012), l’attachement est gouverné de manière stochastique par une probabilité P_α définie comme suit :

$$P_\alpha = 1 - e^{k_\alpha dt}$$

Où k_α est le taux d'attachement et dt le pas de temps de la simulation.

Pour modéliser une probabilité d'attachement non uniforme, on modifie le taux d'attachement k_α en fonction de la position du kinétochore le long du fuseau mitotique avec un préfacteur n_{dep} comme suit :

$$P_\alpha = 1 - e^{k_\alpha dt n_{dep}(d_{KT})}$$

Où d_{KT} représente la distance entre le kinétochore et le pôle auquel il est attaché (c'est à dire la taille du microtubule).

Puisque nous n'avons pas accès à la distribution des extrémités des microtubules au sein du fuseau, une distribution suivant une loi de Cauchy a été choisie (Figure 2.25). Ce type de distribution est préféré par rapport à une distribution gaussienne plus classique à cause de sa longue queue qui permet de ne pas interdire les attachements proches des pôles. On définit $n_{dep}(d_{KT})$ comme suit :

$$n_{dep}(d_{KT}) = \frac{1}{\pi \gamma \left(\frac{d_{KT} - x_0}{\gamma} \right)^2}$$

Où γ est le paramètre d'échelle (correspondant à la largeur de la distribution) et x_0 le paramètre de position qui représente la longueur médiane du microtubule. Afin de garder une valeur moyenne de $n_{dep}(d_{KT})$ proche de 1, on normalise le préfacteur n_{dep} par la valeur moyenne de la distribution calculée le long du fuseau mitotique.

L'implémentation de ce modèle (Figure 2.25) permet d'observer que cette hypothèse est aussi capable de reproduire l'alignement des chromosomes en mitose (Figure 2.24).

Cependant, ni le modèle initial (Gay et al., 2012) ou les modèles avancés ici ne permettent de reproduire précisément les mouvements oscillatoires des kinétochères frères observés de la prométaphase à la métaphase (Jaqaman et al., 2010; Skibbens et al., 1993). Comme illustré par la Biologie, il semble donc que de multiples mécanismes participent aux mouvements coordonnés des chromosomes en mitose.

Hypothesis 2 : Length-dependent KT-MT attachment

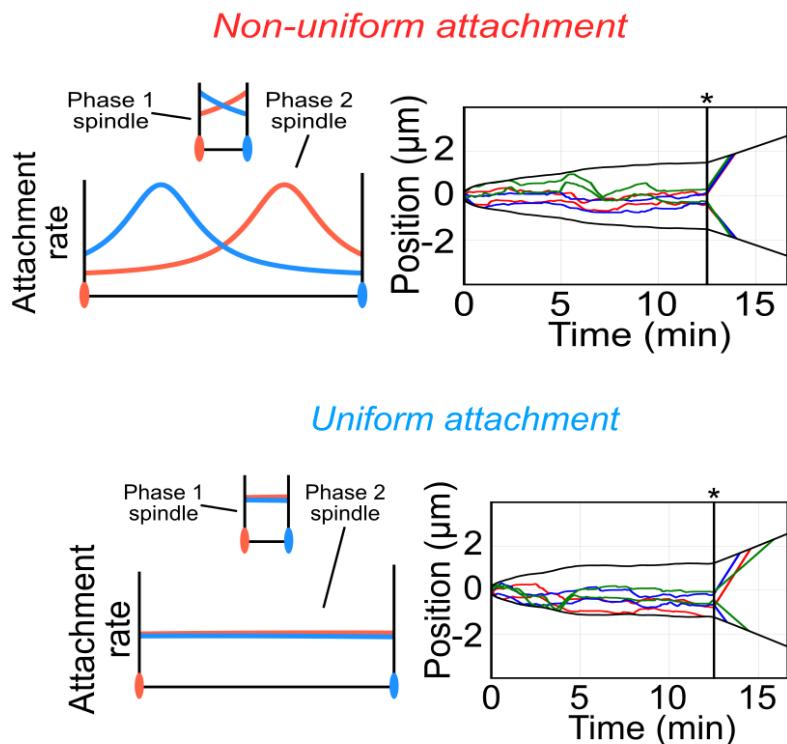


Figure 2.25: Schémas et exemple de trajectoire *in silico* du mécanisme d'alignement avec et sans taux d'attachement dépendant de la longueur. Les flèches correspondent aux forces appliquée sur les kinétochores en fonction de leur position le long du fuseau et leurs tailles illustrent la magnitude des forces.

2.3.3 Vers un modèle d'attachement à trois états

L'instabilité directionnelle des chromosomes *in vivo* n'est pas reproduite par le modèle de force balance présenté jusqu'ici. En effet, les oscillations pourraient requérir un mécanisme encore mal compris afin de synchroniser les deux kinétochores frères et produire ce type de mouvement coordonné (Wan et al., 2012).

On rappelle que le modèle initialement développé par le groupe de Sylvie Tournier ne contient pas de structure pouvant s'apparenter aux microtubules *in vivo*. En effet, le système est composé d'un attachement à deux états, qui peut être; soit « ON » et produire une force en direction du pôle, soit « OFF » et ne produire aucune force (Figure 2.26). Le passage entre les deux états se fait de manière stochastique avec en plus deux mécanismes de corrections qui peuvent modifier les constantes d'attachement et de détachement (voir Gay et al. (2012) pour le fonctionnement de ces deux mécanismes de corrections).

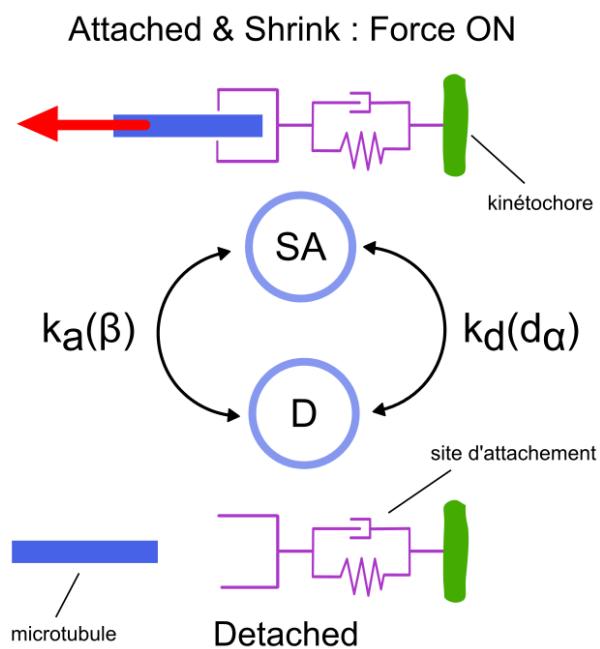


Figure 2.26: Modèle d'attachement à deux états. Le passage d'un état à l'autre est stochastique et régulé par deux mécanismes de corrections gouvernés par les deux paramètres β et d_α (Gay et al., 2012).

Les mouvements des chromosomes dans le modèle sont donc produits par le passage stochastique d'un état à l'autre. L'idée du modèle d'attachement à trois états est d'ajouter un niveau de flexibilité supplémentaire dans la dynamique des attachements et donc aussi dans la dynamique des forces appliquées aux chromosomes dans le but de produire des mouvements oscillatoires représentatifs de ceux observés *in vivo*.

L'ajout d'un état permettrait au système de mieux « imiter » l'action des microtubules

sur la dynamique des attachements sans réellement avoir à modéliser la dynamique des microtubules qui nécessiterait l'ajout de paramètres libres au modèle.

Le concept que les microtubules peuvent « pousser » par polymérisation et « tirer » par dépolymérisation a été proposé dans les années 70 par Inoué et Sato (Inoué and Sato, 1967). Les mécanismes gouvernant la production de ces forces devinrent évidentes lorsque l'instabilité dynamique des microtubules fût découverte (Mitchison and Kirschner, 1984).

Un des mécanismes possible générant la force de poussée (« pushing force » en anglais) serait le cliquet brownien (« brownian ratchet » en anglais) dans lequel les fluctuations thermiques permettrait l'ajout de dimères de tubuline à l'extrémité plus des microtubules (Peskin et al., 1993). Par ailleurs, bien que les forces de poussées ont été observées *in vivo* (Skibbens et al., 1993), il est supposé que leur contribution aux mouvements des chromosomes soient très minoritaires (Khodjakov and Rieder, 1996; Waters et al., 1996) et que la force de traction soit l'acteur majeur gouvernant le mouvement des chromosomes (Inoué and Salmon, 1995).

Le modèle à trois états propose d'intégrer ces observations (Figure 2.27) :

- L'état « détaché » (D) correspond à un site d'attachement sans microtubule et donc sans génération de force.
- L'état « attaché & dépolymérisant » (SA) correspond à un attachement par un microtubule qui génère une force notamment du fait de la dépolymérisation du microtubule.
- L'état « attaché & polymérisant » (GA) correspond à un attachement par un microtubule qui polymérise et donc sans production de force. L'absence de force est en accord avec la faible contribution des forces de poussées au mouvement des chromosomes.

L'implémentation de ce modèle suppose donc que le passage de D à GA (et inversement) et de D à SA (et inversement) soient toujours contrôlés par les deux mécanismes de correction des attachements (β et d_α) déjà décrits dans Gay et al. (2012).

De plus, il est proposé que le passage de GA à SA soit gouverné par le taux de catastrophe, $k_{catastrophe}$, (passage d'un état de polymérisation à un état de dépolymérisation) du microtubule attaché et que le passage de SA à GA soit gouverné par le taux de rescue, k_{rescue} , (passage d'un état de dépolymérisation à un état de polymérisation) du microtubule attaché (Figure 2.27).

Cette implémentation du modèle d'attachement à trois états ajoute donc deux paramètres mais aucune synchronisation entre les kinétochores frères. On suppose donc

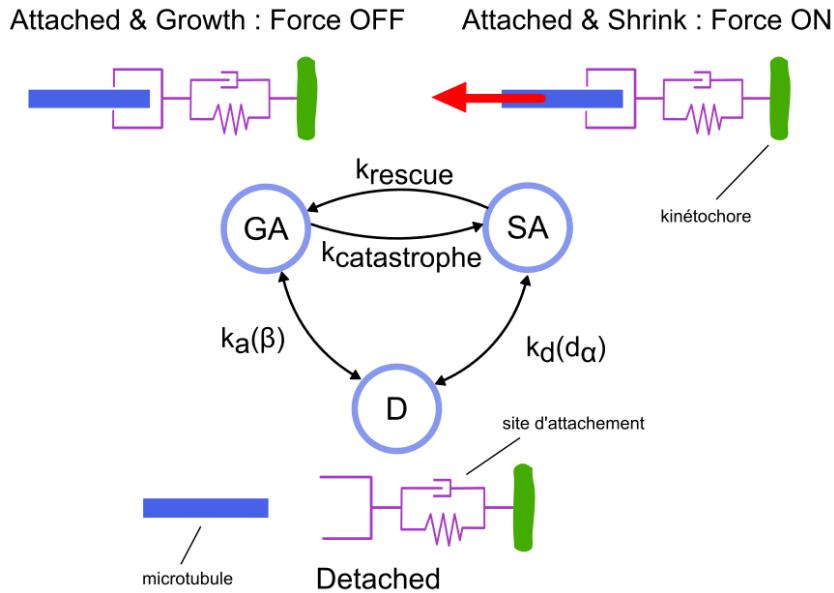


Figure 2.27: Modèle d'attachement à trois états. Les trois états prennent en compte les différentes observations faites entre la génération de la force au niveau du kinétochore et la dynamique des microtubules.

que la présence d'oscillations serait une caractéristique émergente du système (théorie du « kinétochore bête », voir Khodjakov et al. (1999)).

Un modèle plus complexe serait de moduler k_{rescue} et $k_{catastrophe}$ en fonction de la vitesse de déplacement du kinétochore, qui correspond à la vitesse de polymérisation et dépolymérisation du microtubule attaché.

Ainsi, on introduirait dans le système un mécanisme de communication entre les deux kinétochores frères en supposant alors que les oscillations proviennent directement de la capacité des kinétochores à détecter l'état dans lequel ils sont (théorie du « kinétochore intelligent », voir Khodjakov et al. (1999)).

Durant ce travail de thèse, seul une implémentation de la théorie du kinétochore bête (sans modulation de k_{rescue} et $k_{catastrophe}$) a été testée.

La dynamique globale de l'attachement ayant changé, il est nécessaire de recalculer la force de calage de la zone interdigitée (F_{mz}) afin de garder un fuseau en équilibre de force et un taux d'elongation du fuseau mitotique cohérent (pour des détails sur le calcul de la force de calage voir « Parameter estimation > Midzone motors stall force » dans les méthodes de Gay et al. (2012)).

Pour calculer F_{mz} on doit déterminer le nombre moyen de sites d'attachements générant une force appelé $\langle \alpha \rangle$. Il faut donc dans le cas du modèle d'attachement à trois états calculer l'état d'équilibre à l'aide de la matrice de transition des différents états ((Brun et

al., 2009)). Pour cela on suppose que le processus de transition est une chaîne de Markov. Pour simplifier, un processus de Markov est une suite d'états dans lequel les états futurs ne dépendent pas des états passés mais uniquement de l'état présent.

Le modèle à trois états du « kinétochore bête » ajoute deux paramètres k_{rescue} et $k_{catastrophe}$. Bien que ces deux paramètres ajoutés doivent pouvoir être mesurable *in vivo* (Harry, 2014), il a été décidé dans un premier temps de les traiter comme des paramètres libres constraint dans une rang de valeurs acceptables comprises entre $10^{-3}s^{-1}$ et $1s^{-1}$.

Cependant, le nombre de paramètres libres ajoutés par ce modèle a rendu difficile son optimisation afin d'obtenir des simulations stables. Pour le moment, aucun jeux de paramètres n'a encore permis de reproduire des trajectoires de chromosomes comportant des propriétés oscillatoires.

Plusieurs tentatives d'optimisation ciblée avec un nombre de paramètres à tester plus faible ont été tentées mais sans succès.

Il est probable que ce modèle à trois états, bien que complexe, soit capable de reproduire une partie du mouvement des chromosomes observé *in vivo*. Cependant, il manque encore du travail sur l'implémentation numérique ainsi que sur l'optimisation des paramètres.

Il est aussi possible que le modèle du « kinétochore bête » ne soit pas adapté pour reproduire les trajectoires observées *in vivo* et qu'il soit nécessaire d'implémenter le modèle d'attachement à trois états possédant une modulation des taux d'attachements (théorie du « kinétochore intelligent »).

3

Discussion

3.1 L'approche multidisciplinaire comme méthode d'étude en biologie cellulaire

L'explosion des données générées par la biologie dans les années 2000 a basculé cette discipline dans une nouvelle ère. Avant, les chercheurs manquaient de données sur lesquelles travailler ou dépensaient énormément de temps et d'argent à générer une quantité de données significatives et exploitables dans le cadre d'une étude. Depuis l'ère *big data*, du jour au lendemain, les chercheurs ont eu un accès à une quantité de données considérable (notamment provenant de la génomique ou bien de la microscopie) que ni les scientifiques, ni les ordinateurs n'étaient capable de traiter. Bien sûr, il a fallu peu de temps avant que la communauté ne mettent au point de nouvelles techniques d'analyse, conçoivent de nouveaux logiciels de traitement de données et créent même de nouvelles disciplines scientifiques telles que la bioinformatique.

De nos jours, en 2015, ce nouveau paradigme est intégré à tout les niveaux de la recherche. Par exemple l'essor de la bioinformatique a notamment révolutionné certaines disciplines comme l'évolution en autorisant la modélisation phylogénique *in silico* souvent très difficile à reproduire *in vivo* ou *in vitro* dû aux échelles de temps géologique sur lesquels sont basées ces processus.

L'interaction entre la physique et la biologie a quand à elle des racines plus anciennes.

En effet, de nombreux physiciens et les techniques dérivées de la physique ont joué un rôle important dans la naissance de la biologie moléculaire. Par exemple, l'un des deux chercheurs qui découvrit la structure de l'ADN, Francis Crick, avait reçu une formation de physicien et travaillait dans un laboratoire de physique, le Cavendish Laboratory. C'est aussi un physicien théoricien (George Gamow) qui a émis pour la première fois l'idée de l'existence d'un code génétique, un langage qui permet de traduire une séquence de nucléotides en une séquence d'acides aminés.

Bien que le dialogue soit parfois compliqué entre les deux disciplines, il est souvent facile de convaincre les deux partis de travailler sur les mêmes problématiques. Cela montre bien qu'une véritable volonté d'interaction existe. Pour aller plus loin sur ces problématiques d'interaction entre physique et biologie, voir le livre de Claude Debru et al. intitulé « Physique et biologie : une interdisciplinarité complexe » (Debru et al., 2006).

Ce travail de thèse est essentiellement basé sur l'interaction des trois disciplines discutées plus haut :

- La biologie en est la clé de voûte, étant à la base de la problématique étudiée : la compréhension des mécanismes responsables de la dynamique des chromosomes durant la mitose.
- L'approche biophysique a permis à la fois d'appliquer des techniques d'analyses provenant de la physique (comme la MSD par exemple) afin de mieux comprendre la façon dont les chromosomes bougent, mais aussi de tester des hypothèses mécaniques *in silico* sur la façon dont les chromosomes se positionnent le long du fuseau mitotique.
- Enfin, l'outil informatique permet la conception de programmes d'analyse automatique, documentés et libre d'accès. Ces deux derniers points étant à la base d'une recherche reproductive et ouverte qui plus qu'un choix d'orientation doit devenir un devoir. Par ailleurs, le travail d'optimisation des algorithmes est aussi utile car il est souvent à l'origine de gain de temps et de mémoire non négligeable durant les analyses ou les simulations.

Cette approche, même si elle se généralise dans les laboratoires, a permis d'explorer de nouvelles hypothèses à l'origine de la régulation de la dynamique des chromosomes durant la mitose chez la levure.

3.2 La dynamique des chromosomes en mitose

La cellule met en place différents mécanismes afin d'assurer une ségrégation fidèle et efficace de ses chromosomes dupliqués. Plusieurs de ces mécanismes impliquent une stricte régulation spatio-temporelle de la dynamique des chromosomes. Ce travail de thèse a pour objectif de comprendre de quelle façon les mécanismes d'alignement et de mouvement des chromosomes sont régulés et interagissent entre eux. Plusieurs hypothèses élaborées à l'aide d'observations obtenues *in vivo* sont testées *in silico* afin d'évaluer leur pertinence.

3.2.1 Le mécanisme de congression des chromosomes

L'alignement des chromosomes au centre du fuseau mitotique est conservé dans de nombreuses cellules eucaryotes. Cette régulation spatiale implique qu'au moins l'un de ces processus régulant la dynamique des chromosomes soit capable de « détecter » la position du chromosome le long du fuseau.

Il a été montré chez les cellules humaines, que l'une des protéines permettant la congression des chromosomes, est l'homologue de la kinésine-8, appelé Kif18a (Stumpff et al., 2008). Le modèle explique que le caractère hautement processif de la kinésine-8 (Gupta et al., 2006; Varga et al., 2006) lui permet de s'accumuler à l'extrémité plus des microtubules d'une manière dépendante de leur longueur (Varga et al., 2009).

La congression des chromosomes s'établirait donc en régulant la dynamique des chromosomes en fonction de la longueur des microtubules attachés et donc de la position le long du fuseau mitotique (Stumpff et al., 2008).

Ce travail de thèse montre que les homologues de la kinésine-8 chez la levure à fission, appelés Klp5 et Klp6, sont requis pour l'alignement des chromosomes (Mary et al., 2015). La modèle proposé et validé *in silico* est basé sur deux hypothèses.

La première est que Klp5 et Klp6, tout comme ses homologues, s'accumule à l'extrémité du microtubule de façon dépendante de leur longueur. Bien que cette hypothèse ait été confirmée au niveau des microtubules nucléaires en mitose chez la levure à fission (Mary et al., 2015), elle reste controversée car la haute processivité *in vitro* de Klp5 et Klp6 n'a jamais été observée (Erent et al., 2012; Grissom et al., 2009) contrairement à ses homologues humain ou de levure à bourgeon (Stumpff et al., 2011; Varga et al., 2006). Cependant, cela pourrait s'expliquer par le fait que Klp5 et Klp6 agissent sous la forme d'un hétérodimère (Unsworth et al., 2008) et que des modifications essentielles ou bien l'ajout de composants encore non-identifiés manqueraient durant les étapes d'expression

et de purification *in vitro* (Messin and Millar, 2014). En outre, nos résultats sont en accord avec une étude *in vivo* effectuée sur des microtubules cytoplasmiques qui a montré que Klp5 et Klp6 augmentent le taux de catastrophe des microtubules d'une manière dépendante de leur longueur (Tischer et al., 2009).

La seconde hypothèse est que l'augmentation de l'activité dépolymérisatrice des microtubules induite par Klp5 et Klp6 (Erent et al., 2012) soit capable de moduler les forces de traction appliquées au kinétochore de telle sorte que la force appliquée sur un kinétochore éloigné de son pôle soit plus forte que celle appliquée sur un kinétochore proche de son pôle. Cette hypothèse forte est basée sur l'idée que la force générée au kinétochore proviendrait d'un couplage entre les complexes NDC80/DAM1 et les microtubules en dépolymérisation.

L'intégration de ces deux hypothèses dans un modèle mathématique de la ségrégation des chromosomes (Gay et al., 2012) permet la congression des chromosomes le long du fuseau mitotique (Mary et al., 2015).

Ce modèle gros grain est donc basé sur une hypothèse très forte d'un lien entre la dépolymérisation du microtubule et la force appliquée au kinétochore. Les mécanismes moléculaires générant cette force ne sont pas intégrés dans le modèle.

Il a donc été proposé au cours de ce travail un modèle alternatif (voir Section 2.3.2) de congression des chromosomes basé sur une nouvelle hypothèse. En effet les premières études *in vitro* et *in vivo* de l'homologue de la kinésine-8 chez la levure à bourgeon, Kip3p, proposent que la kinésine-8 de part sa processivité et son activité dépolymérisatrice est capable de contrôler la taille des microtubules (Gupta et al., 2006; Varga et al., 2006). Ce même résultat a aussi été obtenu pour l'homologue humain de la kinésine-8, Kif18a (Weaver et al., 2011). De plus, un autre homologue de la kinésine-8, Kif19a, est aussi capable de réguler la longueur des cils cellulaires d'une manière dépendante de sa concentration (Niwa et al., 2012).

L'ensemble de ces observations a servi à l'établissement d'un modèle mathématique décrivant un mécanisme moléculaire qui régule la taille des microtubules (Reese et al., 2014). Cette étude montre que deux protéines antagonistes, la kinésine-8 et XMAP215, sont suffisantes pour réguler la dynamique des microtubules et influencer leur taille (Reese et al., 2014).

Nous avons aussi testé *in silico* l'hypothèse d'un contrôle direct de la taille des microtubules par la kinésine-8 (hypothèse 2) au lieu du contrôle par la kinésine-8 de la force exercée au kinetochore (hypothèse 1) (voir Section 2.3.2).

L'intégration de cette hypothèse s'est effectuée par la modulation spatiale du taux d'attachement des kinétochères. Cette distribution non-linéaire étant censé reproduire

la distribution non-homogène des extrémités plus des microtubules au sein du fuseau. Lorsque la kinésine-8 est présente, la distribution des extrémités plus des microtubules est supposée être en forme de cloche tandis qu'en son absence la distribution est supposée être linéaire.

En accord avec l'hypothèse 2, une distribution non uniforme des extrémités plus des microtubules a été observée chez la levure à fission à l'aide de reconstructions 3D du fuseau mitotique par cryo-microscopie électronique (voir notamment la Figure 12 de Ding et al. (1993) ainsi que la Figure 1 de Ward et al. (2014)). Ce résultat reste cependant à confirmer dû aux déformations du fuseau engendrées par ce type de technique.

Une première tentative d'implémentation de l'hypothèse 2 était basée sur les distributions observées par microscopie électronique des microtubules du fuseau mitotique (Ding et al., 1993; Ward et al., 2014). Cependant, il a été impossible de reproduire la congreSSION des chromosomes en se calant sur ces observations de longueur de microtubules observés par microscopie électronique.

La distribution de longueur de microtubules en forme de cloche a donc été choisie de manière arbitraire et ses paramètres optimisés (nécessité d'ajout d'un paramètre libre au modèle) afin de reproduire l'alignement observé *in vivo* (voir Section 2.3.2).

Les premiers résultats montrent que cette hypothèse 2 reproduit la congreSSION des chromosomes de la même manière qu'avec la première hypothèse (Mary et al., 2015).

Pour finir, on peut souligner que ce travail de thèse confirme le rôle crucial des kinésines dépolymérisatrices comme la kinésine-8 dans des processus cellulaires clés tel que la mitose. En effet, les kinésines dépolymérisatrices contrairement aux autres kinésines sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes testées jusqu'à présent (Wickstead and Gull, 2006). Ceci démontre ainsi que les kinésines, outre leurs rôles dans le transport des vésicules et des organites, possèdent une activité propre à l'origine de la régulation de mécanismes aussi complexes que la dynamique des microtubules. L'évolution a sélectionné ici un outil très puissant capable de moduler de manière spatio-temporelle la concentration d'éléments transportés ou directement des kinésines elles-mêmes à l'intérieur de la cellule.

3.2.2 La régulation du mouvement des chromosomes

Le mouvement des chromosomes est l'un des phénomènes les plus remarquables de la division cellulaire. La génération et la régulation du mouvement d'objets aussi grands dans un espace aussi confiné est un challenge que la cellule a su relever notamment par l'établissement du fuseau mitotique et de structures telle que le kinétochore.

Dans une étude sur l'homologue de la kinésine-8 humaine, Stumpff et al. montre que la protéine Kif18a atténue le mouvement des chromosomes en favorisant l'état de pause à l'extrémité plus du microtubule (Stumpff et al., 2012). Par la suite, ils expliquent que le mécanisme de congression pourrait provenir du fait que l'atténuation des mouvements soit dépendant de la concentration de Kif18a (donc de la longueur dû à sa processivité sur le microtubule).

Ce travail de thèse montre que l'amplitude des oscillations des chromosomes chez *S. pombe* en l'absence de Klp6 est plus important que dans des cellules sauvages (voir la Figure 2 dans Mary et al. (2015)). De plus, Klp6 permet la congression des chromosomes, de la même manière que Kif18a chez l'humain.

Cette observation suggère que la kinésine-8 pourrait agir comme un régulateur du mouvement des chromosomes et confirme donc le résultat de Stumpff et al. (Stumpff et al., 2012).

Cependant, ce travail montre aussi que l'inhibition de l'oscillation des chromosomes n'a que peu ou pas d'effet sur leur congression au centre du fuseau mitotique. De la même façon, en l'absence de la protéine Dam1 chez la levure à fission, l'oscillation des chromosomes est gravement réduite mais leur alignement en metaphase n'est pas affecté (voir l'annexe en Section A.2). Ces deux résultats vont donc à l'encontre de l'hypothèse proposé par Stumpf et al.

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces résultats contradictoires.

On note que l'hypothèse de Stumpff et al. est basée sur le rôle de deux kinésines sur le fuseau mitotique, la kinésine-8, et une chromokinésine, appelée Kid qui généreraient des forces de poussée sur le chromosome (Brouhard and Hunt, 2005; Cassimeris et al., 1994). Les chromokinésines ont aussi été décrites comme favorisant l'alignement des chromosomes chez le xénope (Funabiki and Murray, 2000). Or, la levure à fission ne possède pas de chromokinésines et dès lors il est difficile de comparer les deux hypothèses de congression dans des fuseaux aussi différents.

Il est aussi possible que la congression chez *S. pombe* ait lieu très tôt en prométaphase et donc que Klp5 et Klp6 participent seulement à la stabilité de l'alignement des chromosomes au centre du fuseau. Ceci expliquerait pourquoi l'inhibition des oscillations n'a que peu d'effet sur l'alignement des chromosomes en métaphase.

Ce phénomène de centrage précoce des chromosomes en prométaphase a déjà été décrit chez les mammifères (Kapoor et al., 2006) et il semble que ce processus soit dépendant de la kinésine CENP-E (kinésine-7). La kinésine-7 n'est pas présente chez la levure à fission. Il est toutefois intéressant de noter que Grissom et al. ont observé que Klp5 et Klp6 sont capables de coupler le déplacement d'une charge (une micro-bille) à la dépolymérisation

d'un microtubule *in vitro*. Ils proposent que la kinésine-8 chez *S. pombe* pourrait partager des propriétés avec la kinésine-7 (Grissom et al., 2009). Cela serait alors un exemple du principe stipulant qu'à travers un vaste ensemble phylogénique, le fuseau mitotique et ses composants préservent leurs fonctions mais pas nécessairement l'identité de leurs protéines (McIntosh et al., 2002).

On souligne aussi que les deux modèles mathématiques de la congression des chromosomes proposés durant ce travail (Mary et al. (2015) et Section 2.3.2) reproduisent fidèlement l'alignement des chromosomes sans reproduire totalement leurs oscillations observées *in vivo*.

Cependant, même si les modèles de congression proposés ne reproduisent pas les oscillations, cela ne signifie pas pour autant que les mouvements oscillatoires ne jouent aucun rôle dans la congression. Il serait donc intéressant de pouvoir reproduire les oscillations des chromosomes *in silico* afin d'étudier plus finement leur impact sur la congression.

De plus, deux récentes études montrent chez deux organismes modèles que le mouvement des différentes paires de kinétochères frères serait coordonné et que cette coordination dépendrait d'une kinésine non localisée au kinétochore, la kinésine-5. La première étude (Vladimirov et al., 2013) chez des cellules HeLa montre que les mouvements des différents centromères (CENP-A) sont corrélés les uns avec les autres et que cette corrélation est plus forte lorsque les centromères sont proches. En utilisant un modèle mathématique du mouvement des chromosomes (Joglekar and Hunt, 2002), les auteurs montrent qu'un lien élastique entre les microtubules kinétochoriens est suffisant pour reproduire ces mouvements corrélés en fonction de la distance. Ils observent par ailleurs qu'en inhibant l'homologue de la kinésine-5 humain (Eg5), la corrélation entre les mouvements est augmentée et que ce phénotype est annulé en co-déplétant l'homologue de la kinésine-12 (Kif15). L'autre étude (Stephens et al., 2013a) chez la levure à bourgeon montre aussi que le mouvement de deux centromères sur deux chromosomes différents est coordonné. Cependant, ils observent que chez un mutant déplété pour l'homologue de la kinésine-5 (Cin8), la corrélation des mouvements est réduite contrairement à la première étude sur les cellules HeLa.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats contradictoires comme la différence dans les marqueurs de kinétochères utilisés, les outils utilisés pour corrélérer les trajectoires ou encore les techniques utilisées pour perturber l'action de la kinésine-5 (drogue pour la première étude, déplétion totale dans la seconde). De plus, il faut rappeler que les deux systèmes possèdent d'importantes différences au niveau de la structure du fuseau mitotique. Typiquement, le kinétochore de la levure à bourgeon ne possède qu'un seul microtubule kinétochorien alors que les cellules HeLa en possèdent plusieurs

dizaines.

Quoiqu'il en soit ces deux études montrent très clairement que la dynamique des chromosomes ne peut pas s'expliquer par un seul mécanisme autonome au niveau du kinétochore et qu'il est important pour de prochaines études *in vivo* ou bien *in silico* de prendre en compte l'influence du mouvement des chromosomes les uns par rapport aux autres.

Les reconstructions partielles des trajectoires en utilisant Ndc80-GFP développées durant ce travail de thèse pourraient aider à mesurer une possible corrélation entre le mouvement des chromosomes chez la levure à fission en mitose. Une alternative serait d'utiliser un second marqueur centromérique sur l'un des deux autres chromosomes disponibles (le chromosome I et le chromosome III).

L'ensemble des ces observations montrent donc que les mécanismes responsables du mouvement des chromosomes restent encore mal compris et qu'il est encore difficile de modéliser mathématiquement et de manière fidèle ces phénomènes dans le cadre général de la ségrégation des chromosomes (Gay et al., 2012).

Le modèle mathématique utilisé dans le cadre de ce travail (basé sur les travaux de Tournier et al.) ne fait aucune hypothèse sur le mécanisme moléculaire générant la force au kinétochore et suppose une relation force-vitesse linéaire.

L'un des futurs challenges est de comprendre comment une force générée au niveau de l'un des kinétochères se transmet à son kinetochore frère de manière coordonnée. La régularité et l'efficacité du mouvement d'un chromosome dépend en effet de l'état des deux kinétochères l'un par rapport à l'autre (cohérent ou incohérent).

L'origine de cette synchronisation est encore inconnue bien que des études proposent des hypothèses de processus actifs basés sur la détection de la force (Armond et al., 2015; Burroughs et al., 2015; Vladimirov et al., 2013). En observant la distance entre les kinétochères au moment des changements de direction, Burroughs et al. ont montré que la détection de la tension au niveau du kinétochore ne pouvait pas, à elle seule, expliquer la régularité des mouvements observés (Burroughs et al., 2015). Ils proposent un nouveau modèle dans lequel le changement de direction des kinétochères serait gouverné par une horloge moléculaire au niveau des microtubules. Alors que leurs données semblent supporter que le modèle traditionnel de la détection de la tension est insatisfaisant, ils n'émettent aucune hypothèse sur le mécanisme moléculaire et les acteurs impliqués dans l'horloge moléculaire qu'ils proposent.

Une idée alternative est que l'instabilité directionnelle des chromosomes (Skibbens et al., 1993) est une propriété inhérente des kinétochères et que le changement d'un état P-AP ou AP-P est indépendant de toute influence extérieure. Dès lors, la synchronisation

serait gouvernée par l'instabilité dynamique des microtubules couplée au kinétochore. Ce modèle appelé « dumb kinetochore model » discuté par Khodjakov et al. (Khodjakov et al., 1999) est soutenu par l'observation qu'une partie significative des kinétochères frères sont dans un état d'incohérence chez la levure à fission (voir l'annexe Section 2.2.2) et que 20% des trajectoires de chromosome chez les cellules HeLa possèdent des mouvements « hautement stochastiques » (Burroughs et al., 2015).

Il est possible de tester ces modèles de régulation des mouvements P et AP par deux approches différentes. La première serait de concevoir un modèle mathématique simple en partant de zéro afin de comprendre les mécanismes fondamentaux capable de produire des mouvements oscillatoires. Une première tentative d'implémentation naïve est disponible dans les annexes en Section A.3. Ce modèle est composé de trois paramètres : un taux d'attachement, un taux de détachement ainsi que le nombre de sites d'attachments par kinétochore. Les premiers résultats semblent indiquer que ces trois paramètres ne sont pas suffisants pour obtenir un mouvement régulier suggérant que des mécanismes plus complexes de régulation des attachements sont nécessaires pour ces mouvements.

Il serait donc intéressant de poursuivre l'implémentation du modèle d'attachement à trois états dans le modèle initial de ségrégation des chromosomes sur lequel est basé ce travail (Gay et al., 2012) (voir Section 2.3.3).

Une analyse détaillée des mesures de MSD des trajectoires des chromosomes en métaphase pourraient aussi apporter de précieux indices sur les propriétés biophysiques régulant ce type de mouvement. Cependant la probable convolution de plusieurs phénomènes aux même temps rend l'interprétation des résultats encore difficile.

Pour finir, on note que les études faites sur le mouvement et les oscillations des chromosomes ont presque toujours été conduits chez les eucaryotes supérieurs mais rarement chez des organismes modèles tels que la levure.

Pourtant, il est intéressant de souligner que les mouvements observés chez les levures sont irréguliers (Mary et al., 2015; Stephens et al., 2013b) alors que chez les eucaryotes supérieurs les mouvements observés sont soit réguliers (Jaqaman et al., 2010), soit irréguliers (Burroughs et al., 2015) comme chez la levure.

Dès lors il devient important de se poser la question de savoir non pas comment les chromosomes oscillent mais bien quels mécanismes régissent une telle diversité de mouvement des chromosomes; aussi bien en ce qui concerne les oscillations régulières que les mouvements irréguliers.

Plusieurs différences pourraient expliquer le mouvement irrégulier observé chez les levures. Tout d'abord la taille du fuseau est beaucoup plus faible, tout comme le nombre de

microtubules attachés au kinétochore. Les chromosomes seraient donc soumis à un éventail de forces plus restreintes et seraient donc à ces échelles plus sensibles aux phénomènes stochastiques qui gouvernent la dynamique du fuseau.

Enfin la structure du fuseau de la levure à fission possède des différences notables avec les autres cellules. Sa mitose étant fermé, l'enveloppe nucléaire est toujours présente pendant l'étape de division et pourrait avoir un rôle sur la régulation des forces exercées. De plus la levure à fission ne possède pas de chromokinésines connues pour exercer une force de poussée allant contre le mouvement P des kinétochores (Funabiki and Murray, 2000; Stumpff et al., 2012). Cette force pourrait participer à la régulation de l'équilibre entre le mouvement P et le mouvement AP.

L'équipe a montré récemment (Reyes et al., 2015) que les télomères avaient un rôle important dans la ségrégation des chromosomes. Cependant leurs rôles sur la dynamique des chromosomes reste encore inconnu.

3.2.3 Vers un modèle global de la division cellulaire

La modélisation mathématique n'est pas une fin en soi et ne peut en aucun cas servir de preuve formelle pour expliquer un mécanisme moléculaire. Elle représente simplement une méthode alternative pour proposer une hypothèse et expliquer un mécanisme, au même titre que des expériences conduites *in vitro* ou bien *in vivo*.

Par exemple dans le cadre de ce travail, les deux modèles numériques de congression proposés ouvrent des pistes sur les mécanismes moléculaires possibles qui participent à la congression des chromosomes en métaphase.

Une autre force de la modélisation est sa généralisation possible à d'autres modèles cellulaires en modifiant la géométrie ou bien des paramètres spécifiques. Ce travail de généralisation du modèle de ségrégation des chromosomes est en cours dans l'équipe avec la collaboration de Guillaume Gay ainsi que l'équipe de Jacques Pécreaux (Rennes).

La généralisation d'un modèle à deux organismes ouvrirait la voie vers une modélisation globale capable d'expliquer la diversité des mitoses observées chez différents organismes.

A

Annexes

A.1 Exemple d'utilisation de `kt_simul`

Voici le code Python utilisé pour lancer une simulation de 2000s avec un pas de temps de 10s où l'anaphase (dégradation du ressort cohésine) est déclenché à 1750s.

```
from kt_simul.core.simul_spindle import Metaphase
from kt_simul.io.simuio import SimuIO
from kt_simul.core import parameters

paramtree = parameters.get_default_paramtree()
paramtree['dt'] = 10
paramtree['span'] = 2000
paramtree['t_A'] = 1750

measuretree = parameters.get_default_measuretree()
measuretree['mean_metaph_k_dist'] = 0.3 # 0.3

# Init simu
meta = Metaphase(verbose=True,
                  paramtree=paramtree,
                  measuretree=measuretree,
```

```

        initial_plug='random',
        keep_same_random_seed=False,
        force_parameters=[])

# Launch simu
meta.simul()

# Save results
SimuIO(meta).save("simu.h5")

# Show trajectories (matplotlib needed)
fig = meta.show()

```

Les trajectoires et les états d'attachements peuvent être sauvegardés dans un fichier binaire pour une analyse ultérieure (appelé ici `simu.h5`). Le format binaire contrairement au format texte permet des accès en lecture très rapide.

Il est aussi possible de visualiser les trajectoires des chromosomes et des pôles ainsi que les états d'attachements associés à chaque kinétochore (Figure A.1).

Enfin on peut aussi visualiser la simulation à l'aide d'une interface graphique dynamique (Figure A.2) et du code suivant :

```

from kt_simul.gui.animation import Animator

anim = Animator(meta)
anim.play()

```

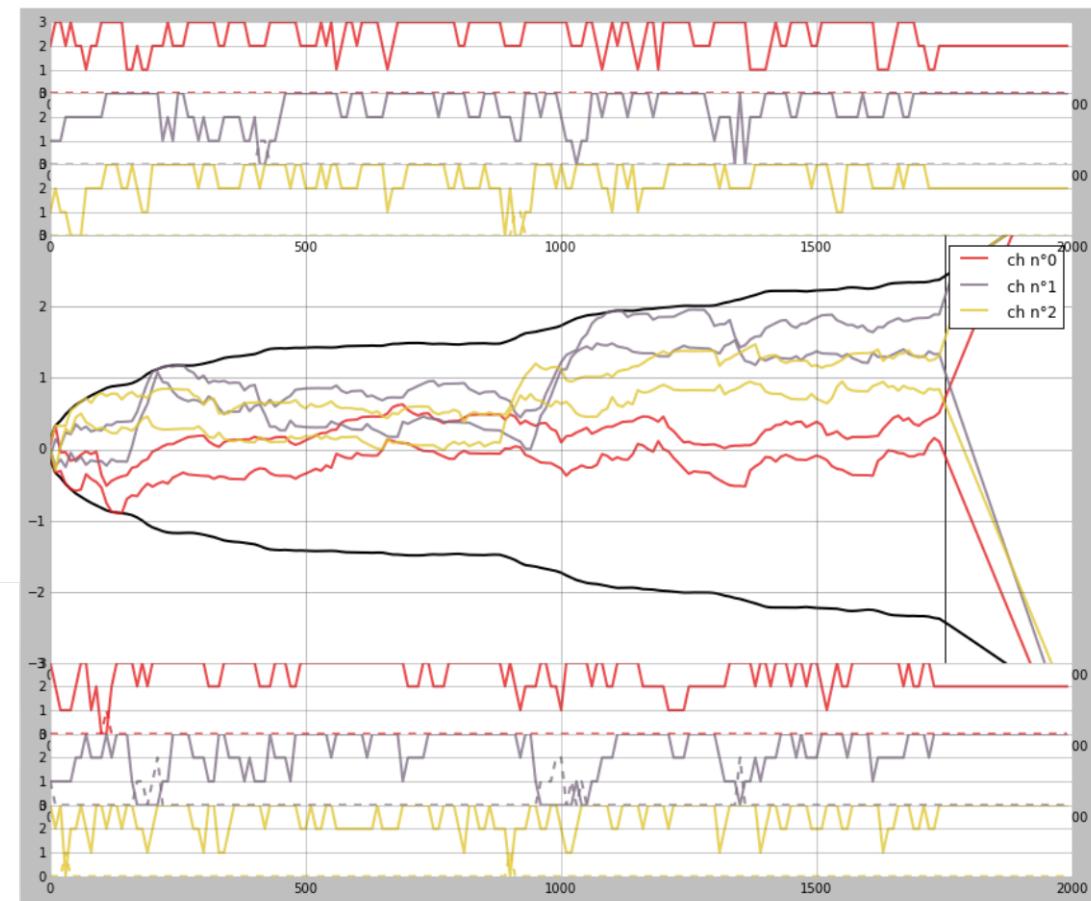


Figure A.1: Exemple de trajectoire générée par kt_simul. En plus de l'évolution de la position (axe des ordonnées) en fonction du temps (axe des abscisses), on visualise aussi les états d'attachements de chaque kinétochore sur les panneaux supérieurs et inférieurs.

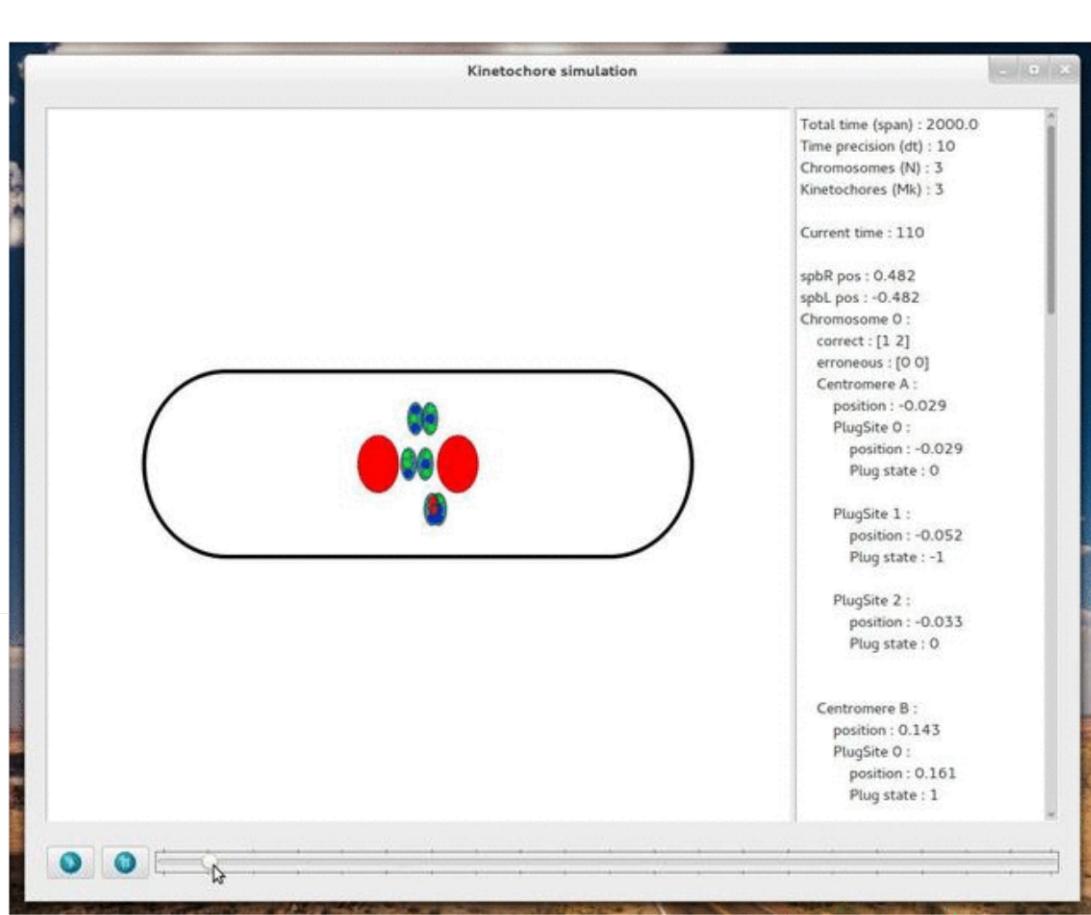


Figure A.2: Animation graphique d'une simulation. L'interface graphique permet de suivre la dynamique en temps réel à l'aide d'un « slider » en bas qui permet de changer le temps. Le panneau à droite permet d'avoir une vue détaillée de la position et de l'attachement de chaque site d'attachement.

A.2 Le complexe DAM1 favorise l'attachement microtubule-kinétochore

Bien que le mutant *dam1Δ* chez la levure à bourgeon soit non viable, celui de la levure à fission est viable. Il montre cependant des problèmes de croissance et une ségrégation anormal des chromosomes (Sanchez-Perez et al., 2005). Il a aussi été montré que la protéine Dam1 chez la levure à fission joue un rôle durant la capture des chromosomes par les microtubules durant la mitose (Gachet et al., 2008).

L'analyse des trajectoires des chromosomes en métaphase et anaphase chez la levure à fission sans la protéine Dam1 montre que cette protéine n'est pas essentielle pour la ségrégation des chromosomes mais est nécessaire pour les mouvements oscillatoires des chromosomes (Figure A.3).

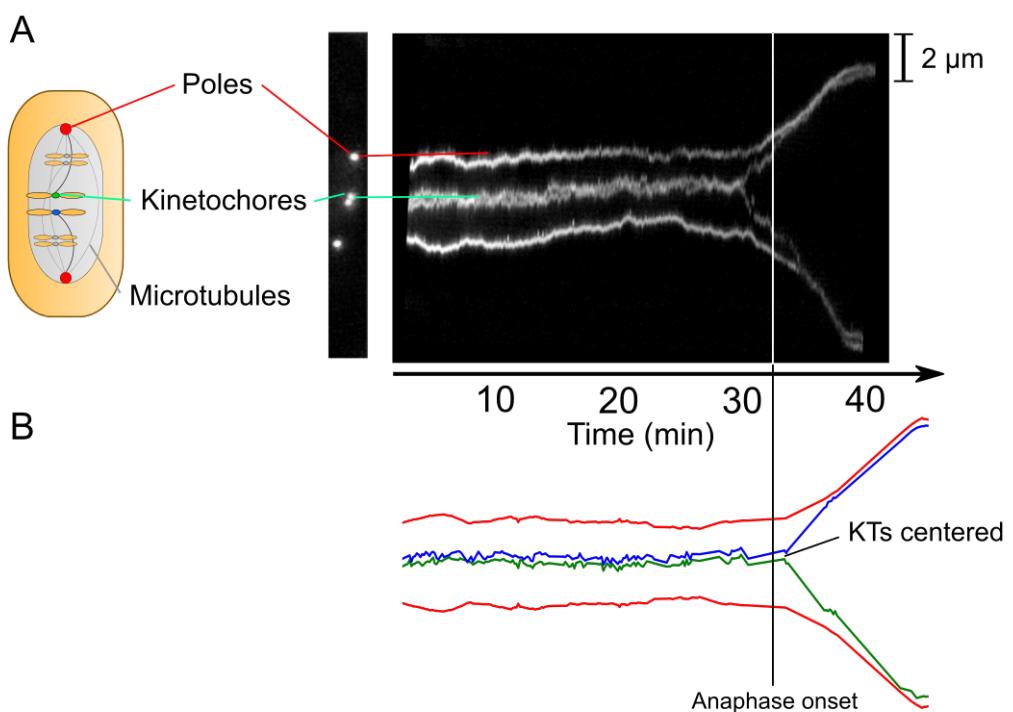


Figure A.3: Trajectoire du chromosome II dans la levure à fission sans Dam1. **A.** Kymographe de la trajectoire des deux pôles du fuseau mitotique et des deux kinétochores du chromosome II durant la métaphase et l'anaphase. **B.** La trajectoire reconstruite du kymographe en **A**.

Bien que les chromosomes n'oscillent pas, ils sont correctement positionnés au centre du fuseau mitotique. Cette observation confirme celle obtenue par l'analyse des trajectoires des chromosomes en présence d'une drogue stabilisatrice des microtubules (Thiabendazole)

ou TBZ) à des concentrations nanomolaires montrant que le centrage des chromosomes était indépendant des oscillations (Mary et al., 2015).

A.3 Paramètres minimums reproduisant un mouvement oscillatoire

A.3.1 Un modèle naïf du mouvement d'un chromosome

Un modèle simple de mouvement d'un chromosome peut être conçu de la façon suivante :

- Un chromosome est représenté par ses deux kinétochores frères.
- Les deux kinétochores frères sont représentés par deux vecteurs V_a et V_b de tailles `n_a` qui représente le nombre de site d'attachements sur un kinétochore.
- Chacune des valeurs contenu dans les vecteurs peut contenir deux valeurs 0 quand il n'est pas attaché et 1 quand il est attaché.
- A chaque pas de temps, on change les valeurs des attachements en fonction d'un paramètre d'attachement `k_a` et d'un paramètre de détachement `k_d`.
- On déplace la position du chromosome en fonction de l'équilibre entre les deux vecteurs de cette façon :

$$\Delta x = \frac{\text{sum}(V_a) - \text{sum}(V_b)}{n_a}$$

Ainsi le chromosome se déplace d'une longueur proportionnelle à la différence du nombre d'attachements entre les deux kinétochores. On normalise ensuite le déplacement en le divisant par `n_a`.

Une implémentation numérique en Python est disponible ci-dessous.

```
import numpy as np

# Parameters
duration = 10 * 60  # seconds
dt = 0.1  # seconds
n_a = 10
```

```

k_a = 0.5 # s-1
k_d = 0.5 # s-1

times = np.arange(0, duration, dt)
N = np.floor(duration / dt).astype("int")

states = np.zeros((N, n_a, 2), dtype="int")
x = np.zeros(N, dtype="float")

for i, t in enumerate(times[:-1]):

    state = states[i]
    next_state = states[i+1]

    # Change attachments
    for idx in np.ndindex(state.shape):

        # Is it unattached ?
        if state[idx] == 0:

            # Roll dice to attach it
            dice = np.random.rand()
            p_a = 1 - np.exp(-k_a*dt)
            if dice < p_a:
                next_state[idx] = 1

        # Is it attached ?
        elif state[idx] == 1:

            # Roll dice to unattach it
            dice = np.random.rand()
            p_d = 1 - np.exp(-k_d*dt)
            if dice < p_d:
                next_state[idx] = 0

    pos = x[i]
    next_pos = x[i+1]

```

```

# Move chromosome
x[i+1] = x[i] + (next_state[:, 1].sum() - next_state[:, 0].sum()) / n_a

```

On peut ensuite visualiser la trajectoire obtenue (Figure A.4) avec le code suivant.

```

import matplotlib.pyplot as plt

plt.plot(times, x)
plt.xlabel("Time (s)")
plt.ylabel("Position (A.U)")

```

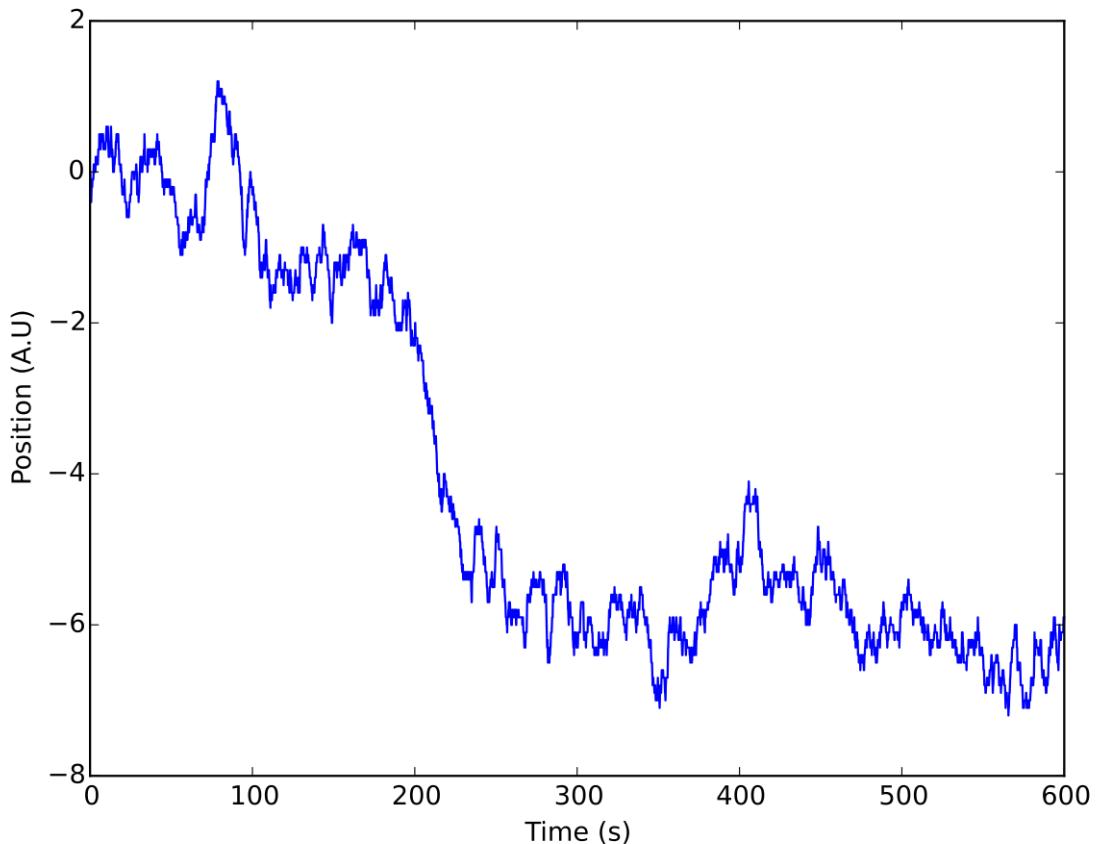


Figure A.4: Exemple de trajectoire générée par le modèle naïf du mouvement d'un chromosome. Les paramètres utilisés pour cette simulation sont $n_a = 10$, $k_a = 0.2$ et $k_d = 0.5$.

A.3.2 Étude des trajectoires avec des techniques d'analyse du signal

Par la suite on applique deux outils communément utilisés en analyse du signal afin de repérer des régularités dans les trajectoires générées.

- L'autocorrélation est la corrélation croisée d'un signal par lui-même. En général, le premier minimum local correspond à la demi-période de la fréquence fondamentale (si jamais cette fréquence existe !).
- La Transformation de Fourier discrète (TFD) décompose une fonction du temps (la trajectoire étudiée) en un spectre de fréquences (un peu à la manière d'un prisme qui décompose la lumière en un spectre de couleurs). Le pic du spectre avec l'amplitude la plus grande correspondent généralement à celui de la fréquence fondamentale.

Ces deux outils permettent par exemple de détecter la fréquence fondamentale d'un signal sinusoïdal généré auquel on a ajouté un bruit tel que l'analyse dans l'espace temporel rend cette fréquence indétectable (Figure A.5).

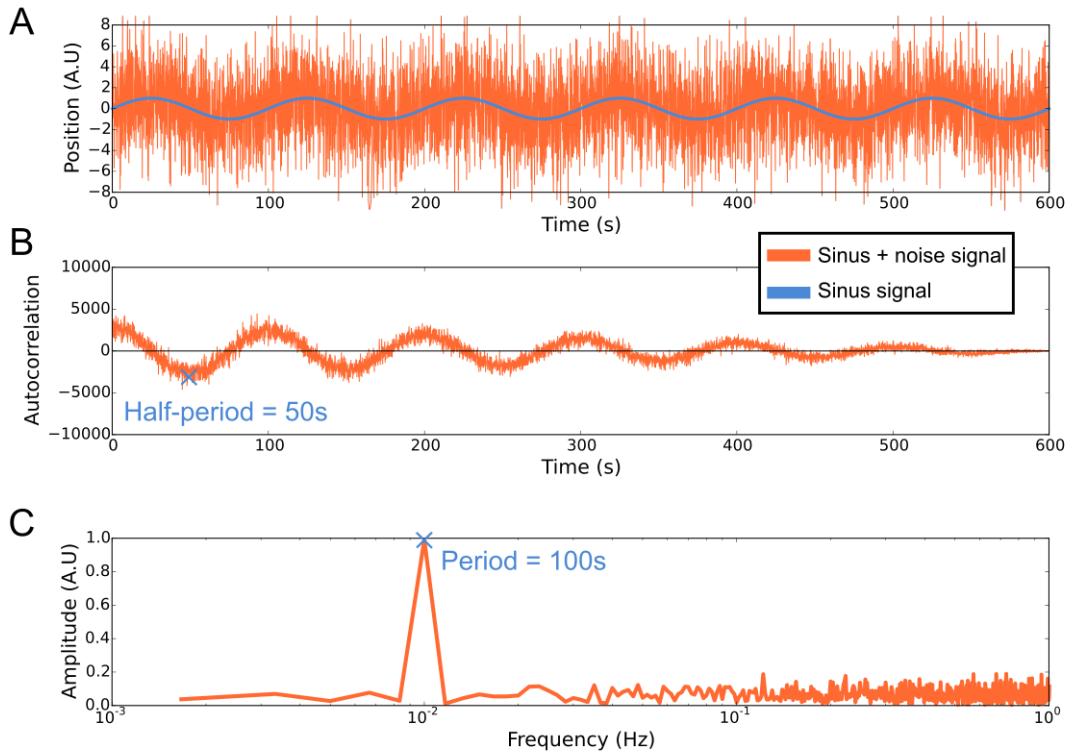


Figure A.5: Autocorrélation et transformée de Fourier d'un signal sinusoïdal bruité. Le signal généré avec la fonction sinus possède une période de 100 s. Le signal orange en **A** correspond au signal sinusoïdal (en bleu) auquel a été ajouté un bruit blanc. **B.** Autocorrélation du signal orange en **A**. **C.** Transformée de Fourier du signal orange en **A**.

A.3.3 Optimisation des paramètres

Le modèle possède donc trois paramètres `n_a`, `k_a` et `k_d` qu'il faut explorer afin de trouver la combinaison capable de générer des trajectoires régulières.

L'exploration est effectué dans l'espace de paramètre composé de la combinaisons de ces trois vecteurs :

```
n_a = [1, 4, 8, 20, 30, 60, 100]  
k_a = [0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1]  
k_d = [0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1]
```

Pour chaque jeu de paramètre cinq simulations sont exécutés pour un total de 1260 simulations. Enfin la durée des simulations est fixée à 3000 s (50 min).

Bien que certaines simulations présentent des mouvements périodiques, aucun des jeux de paramètre testés n'a été capable de reproduire de manière significative un mouvement régulier. La Figure A.6 montre quelques exemples de trajectoires simulées avec leurs autocorrélations et transformées de Fourier associées.

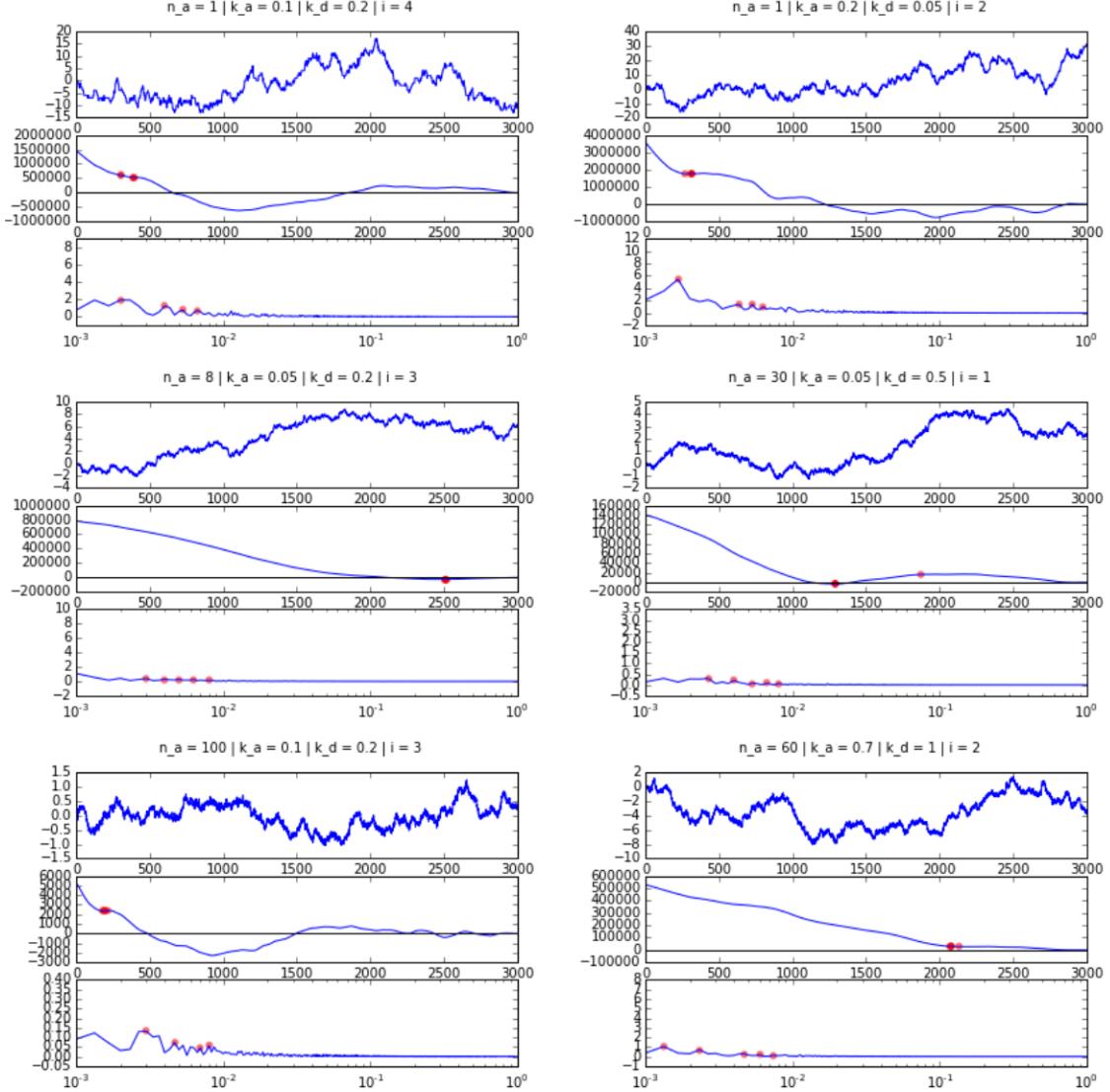


Figure A.6: Quelques exemples de trajectoires avec différents paramètres du modèle naïf du mouvement d'un chromosome. Les trois paramètres des simulations sont affichés en haut de chaque trajectoire. Les points rouges correspondent aux 4 premiers minimum locaux pour l'autocorrélation et aux quatre premiers maximum locaux pour la transformée de Fourier.

Bibliographie

- Akiyoshi, B., Sarangapani, K.K., Powers, A.F., Nelson, C.R., Reichow, S.L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J. a., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2010a). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* *468*, 576–579.
- Akiyoshi, B., Sarangapani, K.K., Powers, A.F., Nelson, C.R., Reichow, S.L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J.A., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2010b). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* *468*, 576–579.
- Alushin, G.M., Ramey, V.H., Pasqualato, S., Ball, D.A., Grigorieff, N., Musacchio, A., and Nogales, E. (2010). The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. *Nature* *467*, 805–810.
- Amaro, A., Samora, C., and Holtackers, R. (2010). Molecular control of kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations. *Nature Cell*
- Antonio, C., Ferby, I., Wilhelm, H., Jones, M., Karsenti, E., Nebreda, a R., and Vernos, I. (2000). Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell* *102*, 425–435.
- Armond, J.W., Vladimirov, E., Erent, M., McAinsh, A.D., and Burroughs, N.J. (2015). Probing microtubule polymerisation state at single kinetochores during metaphase chromosome motion. *Journal of Cell Science* *128*, 1991–2001.
- Auckland, P., and McAinsh, a.D. (2015). Building an integrated model of chromosome congression. *Journal of Cell Science* *128*, 3363–3374.
- Ault, J.G., and Rieder, C.L. (1994). Centrosome and kinetochore movement during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology* *6*, 41–49.
- Bernard, P., Maure, J.F., and Javerzat, J.P. (2001). Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nature Cell Biology* *3*,

522–526.

Black, B.E., and Bassett, E.A. (2008). The histone variant CENP-A and centromere specification. *Current Opinion in Cell Biology* *20*, 91–100.

Boettcher, B., and Barral, Y. (2013). The cell biology of open and closed mitosis. *Nucleus (Austin, Tex.)* *4*, 160–165.

Bowne-Anderson, H., Zanic, M., Kauer, M., and Howard, J. (2013). Microtubule dynamic instability: A new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *BioEssays* *35*, 452–461.

Brouhard, G.J., and Hunt, A.J. (2005). Microtubule movements on the arms of mitotic chromosomes: polar ejection forces quantified in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 13903–13908.

Brown, K.D., Wood, K.W., and Cleveland, D.W. (1996). The kinesin-like protein CENP-E is kinetochore-associated throughout poleward chromosome segregation during anaphase-A. *Journal of Cell Science* *109* (Pt 5), 961–969.

Brun, L., Rupp, B., Ward, J.J., and Nédélec, F. (2009). A theory of microtubule catastrophes and their regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 21173–21178.

Burroughs, N.J., Harry, E.F., and McAinsh, A.D. (2015). Super-resolution kinetochore tracking reveals the mechanisms of human sister kinetochore directional switching. *ELife* *4*, 1–5.

Campàs, O., and Sens, P. (2006). Chromosome oscillations in mitosis. *Physical Review Letters* *97*.

Campbell, C.S., and Desai, A. (2013). Tension sensing by Aurora B kinase is independent of survivin-based centromere localization. *Nature* *497*, 118–121.

Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *13*, 789–803.

Cassimeris, L., Rieder, C., and Salmon, E. (1994). Microtubule assembly and kinetochore directional instability in vertebrate monopolar spindles: implications for the mechanism of chromosome congression. *Journal of Cell Science*.

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

Civelekoglu-Scholey, G., and Cimini, D. (2014). Modelling chromosome dynamics in mitosis: a historical perspective on models of metaphase and anaphase in eukaryotic

cells. *Interface Focus* 4, 20130073.

Civelekoglu-Scholey, G., Sharp, D.J., Mogilner, A., and Scholey, J.M. (2006). Model of chromosome motility in *Drosophila* embryos: adaptation of a general mechanism for rapid mitosis. *Biophysical Journal* 90, 3966–3982.

Cottingham, F., and Hoyt, M. (1997). Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *The Journal of Cell Biology*.

Courtheoux, T., Gay, G., Gachet, Y., and Tournier, S. (2009). Ase1/Prc1-dependent spindle elongation corrects merotely during anaphase in fission yeast. *Journal of Cell Biology* 187, 399–412.

Dagenbach, E.M., and Endow, S.A. (2004). A new kinesin tree. *Journal of Cell Science* 117, 3–7.

Daum, J.R., Wren, J.D., Daniel, J.J., Sivakumar, S., McAvoy, J.N., Potapova, T.A., and Gorbsky, G.J. (2009). Ska3 is required for spindle checkpoint silencing and the maintenance of chromosome cohesion in mitosis. *Current Biology : CB* 19, 1467–1472.

Debru, C., Jacrot, B., and Mache, R. (2006). Physique et biologie : une interdisciplinarité complexe (EDP Sciences).

DeLuca, J.G., Moree, B., Hickey, J.M., Kilmartin, J.V., and Salmon, E.D. (2002). hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *The Journal of Cell Biology* 159, 549–555.

DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., and Salmon, E. (2006). Kinetochore Microtubule Dynamics and Attachment Stability Are Regulated by Hec1. *Cell* 127, 969–982.

Ding, R., McDonald, K.L., and McIntosh, J.R. (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Biology* 120, 141–152.

Du, Y., English, C.a., and Ohi, R. (2010). The Kinesin-8 Kif18A Dampens Microtubule Plus-End Dynamics. *Current Biology* 20, 374–380.

Efremov, A., Grishchuk, E.L., McIntosh, J.R., and Ataullakhanov, F.I. (2007). In search of an optimal ring to couple microtubule depolymerization to processive chromosome motions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19017–19022.

Erent, M., Drummond, D.R., and Cross, R.a. (2012). *S. pombe* kinesins-8 promote

both nucleation and catastrophe of microtubules. *PLoS ONE* *7*, e30738.

Funabiki, H., and Murray, A.W. (2000). The Xenopus Chromokinesin Xkid Is Essential for Metaphase Chromosome Alignment and Must Be Degraded to Allow Anaphase Chromosome Movement. *Cell* *102*, 411–424.

Gachet, Y., Reyes, C., Courthéoux, T., Goldstone, S., Gay, G., Serrurier, C., and Tournier, S. (2008). Sister kinetochore recapture in fission yeast occurs by two distinct mechanisms, both requiring Dam1 and Klp2. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 1646–1662.

Gaitanos, T.N., Santamaria, A., Jeyaprakash, A.A., Wang, B., Conti, E., and Nigg, E.A. (2009). Stable kinetochore-microtubule interactions depend on the Ska complex and its new component Ska3/C13Orf3. *The EMBO Journal* *28*, 1442–1452.

Ganem, N.J., Upton, K., and Compton, D.A. (2005). Efficient Mitosis in Human Cells Lacking Poleward Microtubule Flux. *Current Biology* *15*, 1827–1832.

Gao, Q., Courtheoux, T., Gachet, Y., Tournier, S., and He, X. (2010). A non-ring-like form of the Dam1 complex modulates microtubule dynamics in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 13330–13335.

Garcia, M.A., Koonruggsa, N., and Toda, T. (2002). Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *Current Biology* *12*, 610–621.

Gardner, M.K., Pearson, C.G., Sprague, B.L., Zarzar, T.R., Bloom, K., Salmon, E.D., and Odde, D.J. (2005). Tension-dependent regulation of microtubule dynamics at kinetochores can explain metaphase congression in yeast. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 3764–3775.

Gardner, M.K., Bouck, D.C., Paliulis, L.V., Meehl, J.B., O'Toole, E.T., Haase, J., Soubry, A., Joglekar, A.P., Winey, M., Salmon, E.D., et al. (2008). Chromosome Congregation by Kinesin-5 Motor-Mediated Disassembly of Longer Kinetochore Microtubules. *Cell* *135*, 894–906.

Gay, G., Courtheoux, T., Reyes, C., Tournier, S., and Gachet, Y. (2012). A stochastic model of kinetochore-microtubule attachment accurately describes fission yeast chromosome segregation. *Journal of Cell Biology* *196*, 757–774.

Gestaut, D.R., Graczyk, B., Cooper, J., Widlund, P.O., Zelter, A., Wordeman, L., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2008). Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation. *Nature Cell Biology* *10*, 407–414.

Gibbons, I.R., and Rowe, A.J. (1965). Dynein: A Protein with Adenosine Triphos-

phatase Activity from Cilia. *Science* (New York, N.Y.) *149*, 424–426.

Goldstein, L.S., and Yang, Z. (2000). Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annual Review of Neuroscience* *23*, 39–71.

Gonen, S., Akiyoshi, B., Iadanza, M.G., Shi, D., Duggan, N., Biggins, S., and Gonen, T. (2012). The structure of purified kinetochores reveals multiple microtubule-attachment sites. *Nature Structural & Molecular Biology* *19*, 925–929.

Goshima, G., Wollman, R., Stuurman, N., Scholey, J.M., and Vale, R.D. (2005). Length control of the metaphase spindle. *Current Biology* *15*, 1979–1988.

Grissom, P.M., Fiedler, T., Grishchuk, E.L., Nicastro, D., West, R.R., and McIntosh, J.R. (2009). Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement. *Molecular Biology of the Cell* *20*, 963–972.

Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* *91*, 47–57.

Gupta, M.L., Carvalho, P., Roof, D.M., and Pellman, D. (2006). Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nature Cell Biology* *8*, 913–923.

Hanisch, A., Silljé, H.H.W., and Nigg, E.A. (2006). Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2. *The EMBO Journal* *25*, 5504–5515.

Harry, E. (2014). Metaphase chromosome dynamics investigated by high resolution tracking and data-driven modelling. PhD thesis.

Hill, T.L. (1985). Theoretical problems related to the attachment of microtubules to kinetochores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 4404–4408.

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science* *279*, 519–526.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *10*, 682–696.

Hochegger, H., Hégarat, N., and Pereira-Leal, J.B. (2013). Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle. *Open Biology* *3*,

120185.

Hofmann, C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* Duo1p and Dam1p, Novel Proteins Involved in Mitotic Spindle Function. *The Journal of Cell Biology* *143*, 1029–1040.

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

Hough, L.E., Schwabe, A., Glaser, M.a., McIntosh, J.R., and Betterton, M.D. (2009). Microtubule depolymerization by the kinesin-8 motor Kip3p: A mathematical model. *Biophysical Journal* *96*, 3050–3064.

Howard, J. (2001). Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton.

Huang, H., Hittle, J., Zappacosta, F., Annan, R.S., Hershko, A., and Yen, T.J. (2008). Phosphorylation sites in BubR1 that regulate kinetochore attachment, tension, and mitotic exit. *The Journal of Cell Biology* *183*, 667–680.

Inoué, S., and Salmon, E.D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell* *6*, 1619–1640.

Inoué, S., and Sato, H. (1967). Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *The Journal of General Physiology* *50*, Suppl:259–92.

Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., and Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* *81*, 269–278.

Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S.L., and Danuser, G. (2008). Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature Methods* *5*, 695–702.

Jaqaman, K., King, E.M., Amaro, A.C., Winter, J.R., Dorn, J.F., Elliott, H.L., Mchedlishvili, N., McClelland, S.E., Porter, I.M., Posch, M., et al. (2010). Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere stiffness and microtubule depolymerases. *Journal of Cell Biology* *188*, 665–679.

Joglekar, A.P., and DeLuca, J.G. (2009). Chromosome Segregation: Ndc80 Can Carry the Load. *Current Biology* *19*, R404–R407.

Joglekar, A.P., and Hunt, A.J. (2002). A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements. *Biophysical Journal* *83*, 42–58.

Joglekar, A.P., Bloom, K.S., and Salmon, E.D. (2010). Mechanisms of force generation

by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Current Opinion in Cell Biology* *22*, 57–67.

Jonker, R., and Volgenant, a. (1987). A shortest augmenting path algorithm for dense and sparse linear assignment problems. *Computing* *38*, 325–340.

Kapoor, T.M., Lampson, M. a, Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E.D., McEwen, B.F., and Khodjakov, A. (2006). Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science (New York, N.Y.)* *311*, 388–391.

Ke, K., Cheng, J., and Hunt, A.J. (2009). The Distribution of Polar Ejection Forces Determines the Amplitude of Chromosome Directional Instability. *Current Biology* *19*, 807–815.

Keener, J.P., and Shtylla, B. (2014). A mathematical model of force generation by flexible kinetochore-microtubule attachments. *Biophysical Journal* *106*, 998–1007.

Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (1996). Kinetochores moving away from their associated pole do not exert a significant pushing force on the chromosome. *The Journal of Cell Biology* *135*, 315–327.

Khodjakov, A., Gabashvili, I.S., and Rieder, C.L. (1999). 'Dumb' versus 'smart' kinetochore models for chromosome congression during mitosis in vertebrate somatic cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* *43*, 179–185.

Khodjakov, A., La Terra, S., and Chang, F. (2004). Laser microsurgery in fission yeast; role of the mitotic spindle midzone in anaphase B. *Current Biology : CB* *14*, 1330–1340.

King, K.L., and Cidlowski, J.A. (1995). Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *Journal of Cellular Biochemistry* *58*, 175–180.

Kirschner, M., and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* *45*, 329–342.

Kiyomitsu, T., and Cheeseman, I.M. (2012). Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nature Cell Biology* *14*, 311–317.

Kline-Smith, S.L., Khodjakov, A., Hergert, P., and Walczak, C.E. (2004). Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 1146–1159.

Kops, G.J.P.L., Weaver, B. a a, and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Reviews. Cancer* *5*, 773–785.

Kwon, M., Morales-Mulia, S., Brust-Mascher, I., Rogers, G.C., Sharp, D.J., and Scholey, J.M. (2004). The chromokinesin, KLP3A, diverts mitotic spindle pole separation during

prometaphase and anaphase and facilitates chromatid motility. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 219–233.

Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nature Cell Biology* *6*, 232–237.

Lansky, Z., Braun, M., Lüdecke, A., Schlierf, M., Wolde, P.R. ten, Janson, M.E., and Diez, S. (2015). Diffusible Crosslinkers Generate Directed Forces in Microtubule Networks. *Cell* *1–10*.

Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Current Biology* *22*, R966–R980.

Leupold, U. (1957). Physiologisch-genetische Studien an adenin-abhängigen Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*. *Pathobiology* *20*, 535–543.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). Overview of the Cell Cycle and Its Control (W. H. Freeman).

Maddox, P., Straight, A., Coughlin, P., Mitchison, T.J., and Salmon, E.D. (2003). Direct observation of microtubule dynamics at kinetochores in Xenopus extract spindles: implications for spindle mechanics. *The Journal of Cell Biology* *162*, 377–382.

Maney, T., and Hunter, A. (1998). Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *The Journal of Cell*

Mary, H., Fouchard, J., Gay, G., Reyes, C., Gauthier, T., Gruget, C., Pecreaux, J., Tournier, S., and Gachet, Y. (2015). Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations. *Journal of Cell Science* *128*, 3720–3730.

Mata, J., and Nurse, P. (1997). tea1 and the Microtubular Cytoskeleton Are Important for Generating Global Spatial Order within the Fission Yeast Cell. *Cell* *89*, 939–949.

Mayr, M.I., Hümmel, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G., and Mayer, T.U. (2007). The Human Kinesin Kif18A Is a Motile Microtubule Depolymerase Essential for Chromosome Congression. *Current Biology* *17*, 488–498.

McCleland, M.L., Kallio, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Kestner, C.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Gorbsky, G.J., and Stukenberg, P. (2004). The Vertebrate Ndc80 Complex Contains Spc24 and Spc25 Homologs, which Are Required to Establish and Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment. *Current Biology* *14*, 131–137.

McEwen, B.F., Dong, Y., and VandenBeldt, K.J. (2007). Using electron microscopy to understand functional mechanisms of chromosome alignment on the mitotic spindle.

Methods in Cell Biology 79, 259–293.

McIntosh, J.R. (2012). Motors or dynamics: what really moves chromosomes? Nature Cell Biology 14, 1234.

McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., and West, R.R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. Annual Review of Cell and Developmental Biology 18, 193–219.

McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., Morphew, M.K., Efremov, A.K., Zhudenkov, K., Volkov, V.A., Cheeseman, I.M., Desai, A., Mastronarde, D.N., and Ataullakhanov, F.I. (2008). Fibrils Connect Microtubule Tips with Kinetochores: A Mechanism to Couple Tubulin Dynamics to Chromosome Motion. Cell 135, 322–333.

McIntosh, J.R., Volkov, V., Ataullakhanov, F.I., and Grishchuk, E.L. (2010). Tubulin depolymerization may be an ancient biological motor. Journal of Cell Science 123, 3425–3434.

Messin, L.J., and Millar, J.B. a (2014). Role and regulation of kinesin-8 motors through the cell cycle. Systems and Synthetic Biology 205–213.

Miranda, J.J.L., De Wulf, P., Sorger, P.K., and Harrison, S.C. (2005). The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules. Nature Structural & Molecular Biology 12, 138–143.

Mitchison, T. (1989). Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. The Journal of Cell Biology.

Mitchison, T.J. (1992). Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis. The Journal of Cell Biology 119, 569–582.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. Nature 312, 237–242.

Mogilner, A., and Craig, E. (2010). Towards a quantitative understanding of mitotic spindle assembly and mechanics. Journal of Cell Science 123, 3435–3445.

Mogilner, A., Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., and Scholey, J. (2006). Modeling mitosis. Trends in Cell Biology 16, 88–96.

Monnier, N., Guo, S.-M., Mori, M., He, J., Lénárt, P., and Bathe, M. (2012). Bayesian Approach to MSD-Based Analysis of Particle Motion in Live Cells.

Morgan, D.O. (2007). The Cell Cycle: Principles of Control (New Science Press).

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space

and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *8*, 379–393.

Nabeshima, K., and Nakagawa, T. (1998). Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. *Molecular Biology of*

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annual Review of Genetics* *43*, 525–558.

Nasmyth, K.A., and Reed, S.I. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *77*, 2119–2123.

Nedelec, F., and Foethke, D. (2007). Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers. *New Journal of Physics* *9*.

Nicklas, R.B. (1983). Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *Journal of Cell Biology* *97*, 542–548.

Nicklas, R.B., and Ward, S.C. (1994). Elements of error correction in mitosis: Microtubule capture, release, and tension. *Journal of Cell Biology* *126*, 1241–1253.

Nicklas, R.B., Kubai, D.F., and Hays, T.S. (1982). Spindle microtubules and their mechanical associations after micromanipulation in anaphase. *Journal of Cell Biology* *95*, 91–104.

Nicklas, R.B., Ward, S.C., and Gorbsky, G.J. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *Journal of Cell Biology* *130*, 929–939.

Niwa, S., Nakajima, K., Miki, H., Minato, Y., Wang, D., and Hirokawa, N. (2012). KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. *Developmental Cell* *23*, 1167–1175.

Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry* *61*, 441–470.

Novak, B., and Tyson, J.J. (1995). Quantitative analysis of a molecular model of mitotic control in fission yeast. *Journal of Theoretical Biology* *173*, 283–305.

Nurse, P., and Thuriaux, P. (1980). REGULATORY GENES CONTROLLING MITOSIS IN THE FISSION YEAST SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE. *Genetics* *96*, 627–637.

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.

Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., and Jung, M.K. (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* *61*, 1289–1301.

Ogawa, T., Nitta, R., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2004). A common mechanism for microtubule destabilizers—M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell*.

Oliphant, T.E. (2007). SciPy: Open source scientific tools for Python. *Computing in Science and Engineering* *9*, 10–20.

Oliveira, R. a, Hamilton, R.S., Pauli, A., Davis, I., and Nasmyth, K. (2010). Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nature Cell Biology* *12*, 185–192.

O'Connell, C., and Lončarek, J. (2008). The spindle assembly checkpoint is satisfied in the absence of interkinetochore tension during mitosis with unreplicated genomes. *The Journal of Cell*

Pasteur, L. (1862). Oeuvres de Pasteur. Tome 2 / réunies par Pasteur Vallery-Radot,...

Paul, R., Wollman, R., Silkworth, W.T., Nardi, I.K., Cimini, D., and Mogilner, A. (2009). Computer simulations predict that chromosome movements and rotations accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 15708–15713.

Peskin, C.S., Odell, G.M., and Oster, G.F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophysical Journal* *65*, 316–324.

Peters, C., Brejc, K., Belmont, L., Bodey, A.J., Lee, Y., Yu, M., Guo, J., Sakowicz, R., Hartman, J., and Moores, C. a (2010). Insight into the molecular mechanism of the multitasking kinesin-8 motor. *The EMBO Journal* *29*, 3437–3447.

Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *12*, 427–438.

Powers, A.F., Franck, A.D., Gestaut, D.R., Cooper, J., Gracyzk, B., Wei, R.R., Worde-man, L., Davis, T.N., and Asbury, C.L. (2009). The Ndc80 Kinetochore Complex Forms Load-Bearing Attachments to Dynamic Microtubule Tips via Biased Diffusion. *Cell* *136*, 865–875.

Raaijmakers, J.A., Tanenbaum, M.E., Maia, A.F., and Medema, R.H. (2009). RAMA1 is a novel kinetochore protein involved in kinetochore-microtubule attachment. *Journal*

of Cell Science *122*, 2436–2445.

Reese, L., Melbinger, A., and Frey, E. (2014). Molecular Mechanisms for Microtubule Length Regulation by Kinesin-8 and XMAP215 Proteins. *Interface Focus 4*, 1–21.

Reyes, C., Serrurier, C., Gauthier, T., Gachet, Y., and Tournier, S. (2015). Aurora B prevents chromosome arm separation defects by promoting telomere dispersion and disjunction. *The Journal of Cell Biology 208*, 713–727.

Richard McIntosh, J., O'Toole, E., Zhudenkov, K., Morphew, M., Schwartz, C., Ataullakhanov, F.I., and Grishchuk, E.L. (2013). Conserved and divergent features of kinetochores and spindle microtubule ends from five species. *Journal of Cell Biology 200*, 459–474.

Rieder, C.L. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *The Journal of Cell Biology 127*, 1301–1310.

Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (1994). Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *Journal of Cell Biology 124*, 223–233.

Rieder, C.L., Davison, E.A., Jensen, L.C., Cassimeris, L., and Salmon, E.D. (1986). Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. *The Journal of Cell Biology 103*, 581–591.

Robinett, C.C. (1996). In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *The Journal of Cell Biology 135*, 1685–1700.

Sanchez-Perez, I., Renwick, S.J., Crawley, K., Karig, I., Buck, V., Meadows, J.C., Franco-Sanchez, A., Fleig, U., Toda, T., and Millar, J.B. a (2005). The DASH complex and Klp5/Klp6 kinesin coordinate bipolar chromosome attachment in fission yeast. *The EMBO Journal 24*, 2931–2943.

Santaguida, S., and Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *The EMBO Journal 28*, 2511–2531.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods 9*, 676–682.

Schmidt, J.C., Arthanari, H., Boeszoeremenyi, A., Dashkevich, N.M., Wilson-Kubalek, E.M., Monnier, N., Markus, M., Oberer, M., Milligan, R.a., Bathe, M., et al. (2012).

The Kinetochore-Bound Ska1 Complex Tracks Depolymerizing Microtubules and Binds to Curved Protofilaments. *Developmental Cell* *23*, 968–980.

Sergé, A., Bertiaux, N., Rigneault, H., and Marguet, D. (2008). Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nature Methods* *5*, 687–694.

Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* *407*, 41–47.

Shtylla, B., and Keener, J.P. (2011). A Mathematical Model for Force Generation at the Kinetochore-Microtubule Interface. *SIAM Journal on Applied Mathematics* *71*, 1821–1848.

Skibbens, R.V., Skeen, V.P., and Salmon, E.D. (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: A push-pull mechanism. *Journal of Cell Biology* *122*, 859–875.

Skibbens, R.V., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (1995). Kinetochore motility after severing between sister centromeres using laser microsurgery: evidence that kinetochore directional instability and position is regulated by. *Journal of Cell Science* *108* (Pt 7), 2537–2548.

Stephens, A.D., Haggerty, R.a., Vasquez, P.a., Vicci, L., Snider, C.E., Shi, F., Quammen, C., Mullins, C., Haase, J., Taylor, R.M., et al. (2013a). Pericentric chromatin loops function as a nonlinear spring in mitotic force balance. *Journal of Cell Biology* *200*, 757–772.

Stephens, A.D., Snider, C.E., Haase, J., Haggerty, R. a, Vasquez, P. a, Forest, M.G., and Bloom, K. (2013b). Individual pericentromeres display coordinated motion and stretching in the yeast spindle. *The Journal of Cell Biology* *203*, 407–416.

Stumpff, J., Dassow, G. von, Wagenbach, M., Asbury, C., and Wordeman, L. (2008). The Kinesin-8 Motor Kif18A Suppresses Kinetochore Movements to Control Mitotic Chromosome Alignment. *Developmental Cell* *14*, 252–262.

Stumpff, J., Du, Y., English, C.A., Maliga, Z., Wagenbach, M., Asbury, C.L., Wordeman, L., and Ohi, R. (2011). A tethering mechanism controls the processivity and kinetochore-microtubule plus-end enrichment of the kinesin-8 Kif18A. *Molecular Cell* *43*, 764–775.

Stumpff, J., Wagenbach, M., Franck, A., Asbury, C.L., and Wordeman, L. (2012). Kif18A and Chromokinesins Confine Centromere Movements via Microtubule Growth Suppression and Spatial Control of Kinetochore Tension. *Developmental Cell* *22*, 1017–

1029.

Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of Cell Biology* *154*, 925–936.

Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J.R., and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* *108*, 317–329.

Theis, M., Slabicki, M., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Sontheimer, J., Kittler, R., Heninger, A.-K., Glatter, T., Kruusmaa, K., Poser, I., et al. (2009). Comparative profiling identifies C13orf3 as a component of the Ska complex required for mammalian cell division. *The EMBO Journal* *28*, 1453–1465.

Tien, J.F., Umbreit, N.T., Gestaut, D.R., Franck, A.D., Cooper, J., Wordeman, L., Gonen, T., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2010). Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B. *Journal of Cell Biology* *189*, 713–723.

Tirnauer, J., and Canman, J. (2002). EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Molecular Biology of ...*

Tischer, C., Brunner, D., and Dogterom, M. (2009). Force- and kinesin-8-dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics. *Molecular Systems Biology* *5*, 250.

Tokai, N., Fujimoto-Nishiyama, A., Toyoshima, Y., Yonemura, S., Tsukita, S., Inoue, J., and Yamamoto, T. (1996a). Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. *The EMBO Journal* *15*, 457–467.

Tokai, N., Fujimoto-Nishiyama, A., Toyoshima, Y., Yonemura, S., Tsukita, S., Inoue, J., and Yamamoto, T. (1996b). Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. *The EMBO Journal* *15*, 457–467.

Unsworth, A., Masuda, H., Dhut, S., and Toda, T. (2008). Fission yeast kinesin-8 Klp5 and Klp6 are interdependent for mitotic nuclear retention and required for proper microtubule dynamics. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 5104–5115.

Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* *112*, 467–480.

Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A. a, Tanaka, T.U., and Howard, J. (2006). Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nature Cell*

Biology 8, 957–962.

Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S., and Howard, J. (2009). Kinesin-8 Motors Act Cooperatively to Mediate Length-Dependent Microtubule Depolymerization. *Cell* 138, 1174–1183.

Vasquez, R.J., Howell, B., Yvon, a M., Wadsworth, P., and Cassimeris, L. (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Molecular Biology of the Cell* 8, 973–985.

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

Vladimirou, E., Mcchedlishvili, N., Gasic, I., Armond, J., Samora, C., Meraldi, P., and McAinsh, A. (2013). Nonautonomous Movement of Chromosomes in Mitosis. *Developmental Cell* 27, 411–424.

Walczak, C.E., Mitchison, T.J., and Desai, A. (1996). XKCM1: A Xenopus Kinesin-Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly. *Cell* 84, 37–47.

Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 91–102.

Walczak, C.E., Gayek, S., and Ohi, R. (2013). Microtubule-Depolymerizing Kinesins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29, 130722103520007.

Wan, X., Cimini, D., Cameron, L.a., and Salmon, E.D. (2012). The coupling between sister kinetochore directional instability and oscillations in centromere stretch in metaphase PtK1 cells. *Molecular Biology of the Cell* 23, 1035–1046.

Wang, S.Z., and Adler, R. (1995). Chromokinesin: A DNA-binding, kinesin-like nuclear protein. *Journal of Cell Biology* 128, 761–768.

Ward, J.J., Roque, H., Antony, C., and Nédélec, F. (2014). Mechanical design principles of a mitotic spindle. *ELife* 4, 1–28.

Wargacki, M.M., Tay, J.C., Muller, E.G., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2010). Kip3, the yeast kinesin-8, is required for clustering of kinetochores at metaphase. *Cell Cycle* 9, 2581–2588.

Waters, J.C., Skibbens, R.V., and Salmon, E.D. (1996). Oscillating mitotic newt lung cell kinetochores are, on average, under tension and rarely push. *Journal of Cell Science* 109 (Pt 1), 2823–2831.

Watson, J.D., Crick, F.H.C., and Others (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171, 737–738.

Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., Stout, J.R., Leblanc, C., Shaw, S.L., Gardner, M.K.,

and Walczak, C.E. (2011). Kif18A uses a microtubule binding site in the tail for plus-end localization and spindle length regulation. *Current Biology* *21*, 1500–1506.

Wei, R.R., Sorger, P.K., and Harrison, S.C. (2005). Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 5363–5367.

Welburn, J.P., Grishchuk, E.L., Backer, C.B., Wilson-Kubalek, E.M., Yates, J.R., and Cheeseman, I.M. (2009). The Human Kinetochore Ska1 Complex Facilitates Microtubule Depolymerization-Coupled Motility. *Developmental Cell* *16*, 374–385.

West, R.R., Malmstrom, T., and McIntosh, J.R. (2002). Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *Journal of Cell Science* *115*, 931–940.

Westermann, S., Avila-Sakar, A., Wang, H.W., Niederstrasser, H., Wong, J., Drubin, D.G., Nogales, E., and Barnes, G. (2005). Formation of a dynamic kinetochore-microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex. *Molecular Cell* *17*, 277–290.

Westermann, S., Wang, H.-W., Avila-Sakar, A., Drubin, D.G., Nogales, E., and Barnes, G. (2006). The Dam1 kinetochore ring complex moves processively on depolymerizing microtubule ends. *Nature* *440*, 565–569.

Wickstead, B., and Gull, K. (2006). A “holistic” kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. *Molecular Biology of the Cell*.

Wigge, P.A., and Kilmartin, J.V. (2001). The Ndc80p Complex from *Saccharomyces cerevisiae* Contains Conserved Centromere Components and Has a Function in Chromosome Segregation. *The Journal of Cell Biology* *152*, 349–360.

Woelke, A.L., Murgueitio, M.S., and Preissner, R. (2010). Theoretical modeling techniques and their impact on tumor immunology.

Wollman, R., Cytrynbaum, E.N., Jones, J.T., Meyer, T., Scholey, J.M., and Mogilner, A. (2005). Efficient chromosome capture requires a bias in the ‘search-and-capture’ process during mitotic-spindle assembly. *Current Biology : CB* *15*, 828–832.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-a., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, a, Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* *415*, 871–880.

Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2003). Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast.

EMBO Journal 22, 2284–2296.

Yang, Z., Kenny, A., Brito, D., and Rieder, C. (2009). Cells satisfy the mitotic checkpoint in Taxol, and do so faster in concentrations that stabilize syntelic attachments. The Journal of Cell Biology.

Ye, A.A., Deretic, J., Hoel, C.M., Hinman, A.W., Cimini, D., Welburn, J.P., and Maresca, T.J. (2015). Aurora A Kinase Contributes to a Pole-Based Error Correction Pathway. Current Biology : CB 25, 1842–1851.

Zaytsev, A.V., Sundin, L.J.R., DeLuca, K.F., Grishchuk, E.L., and DeLuca, J.G. (2014). Accurate phosphoregulation of kinetochore-microtubule affinity requires unconstrained molecular interactions. Journal of Cell Biology 206, 45–59.

Zheng, Y., Wong, M., Alberts, B., and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. Nature.