



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
ANDREA PARMEGGIANI
BENOIT ARCANGIOLI
EMMANUELLE FABRE
YANNICK GACHET
SYLVIE TOURNIER
GUILLAUME GAY

Professeur d'Université
Directeur de Recherche
Professeur d'Université
Directeur de recherche
Directeur de Recherche
Directeur de Recherche
Chercheur Indépendant

Président du Jury
Membre du Jury Invité
Membre du Jury Invité

École doctorale et spécialité :

École Doctorale Biologie Santé Biotechnologies

Unité de Recherche :

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

Directeur(s) de Thèse :

Sylvie Tournier et Yannick Gachet

Rapporteurs :

Benoit Arcangioli et Emmanuelle Fabre

« The dream of every cell is to become two cells. »

François Jacob, 1974

Résumé

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

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

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

Il 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 (appelé instabilité dynamique des microtubules) ou l'effet de différentes protéines sur les microtubules comme les MAPs et les kinésines. 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 par ailleurs largement contrôlée par un grand nombre d'acteurs autres que les microtubules. Certains d'entre eux étant responsables de l'attachement MTs-kinétochore comme les complexes NDC80 et DAM1, tandis que d'autres sont impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules comme la kinésine-8 et la kinésine-13.

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

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

Summary

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

Chromatids are the indivisible units of genetic material during mitosis just like atoms in a molecule. Originally each of these « objects » is not attached and located without a specific order. All the complexity of mitosis is to attach each of the chromatids to the correct pole to be able to exert forces and then position them on the metaphasic plate at the center of the mitotic spindle just before their separation and migration toward the poles during anaphase.

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

It would seem that the origin of chromosome movements comes largely from microtubule dynamics. What is less clear is the relative weight of the various processes regulating the movement: the intrinsic dynamic instability of microtubules or the effect of their associated proteins such as MAPs and kinesins. Note also that the energy transfer mechanism between microtubule dynamics and movement of chromosomes is still largely hypothetical.

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

During my PhD work I studied chromosome dynamic during mitosis in fission yeast which has the advantage of sharing many fundamental mechanisms of symmetric division with higher eukaryotes. Two mechanisms that are found in many cells are chromosome alignment during metaphase and a back and forth movement more or less uniform along the spindle called chromosomes oscillation. By analyzing chromosomes trajectories I showed that both processes are in large part independent in fission yeast (article accepted for publication). Moreover the chromosome alignment process, still not well understood, is in part regulated by the kinesin-8 via a length dependent activity on the microtubules. This suggests that a protein, the kinesin-8, is capable of providing a spatial information along the mitotic spindle to properly position chromosomes. Finally, I used a mathematical model of the mitotic spindle, in order to test quantitatively different hypotheses about chromosome centering mechanism by the kinesin-8.

This work thus examines the control of the movement, the attachment and the positioning of chromosomes during mitosis and seeks to better understand the mitotic spindle biophysics.

Remerciements

...

Table des matières

Résumé	i
Summary	iii
Remerciements	v
1 Introduction	1
1.1 La vie d'une cellule	3
1.2 La mitose : une étape du cycle cellulaire	5
1.2.1 Les phases de la mitose	5
1.2.2 Le kinétochore	8
1.2.3 Les microtubules	9
1.2.4 Les kinésines dépolymérisatrice de microtubule	10
1.2.5 L'ancre du microtubule au kinétochore	13
1.2.6 Les différents types d'attachements	14
1.3 La métaphase : point d'orgue de la division cellulaire	16
1.3.1 La congression des chromosomes	17
1.3.2 Le fuseau mitotique : un objet sous contrainte	18
1.3.3 Le point de contrôle de la transition métaphase/anaphase . .	19
1.4 Modélisation mathématique de la mitose	20
1.4.1 La modélisation : quésako ?	21
1.4.2 L'assemblage du fuseau mitotique	23

1.4.3	La dynamique des chromosomes	25
1.5	La levure à fission : un organisme modèle pour l'étude du cycle cellulaire	26
1.6	Problématique	28
2	Résultats	31
2.1	« Fission yeast Kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations »	31
2.2	Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase	44
2.2.1	La reconstruction des trois chromosomes de la levure à fission : un challenge ?	44
2.2.2	Traitements des trajectoires par des techniques d'analyse du signal	44
2.2.3	Peut-on inférer l'état d'attachement par l'analyse de la trajectoire ?	44
2.2.4	Analyse du mouvement des chromosomes par des approches bayésiennes	44
2.3	Modélisation bio-mécanique du fuseau mitotique	44
2.3.1	Un modèle de congression alternatif	44
2.3.2	Vers un modèle d'attachement à trois états	44
3	Discussion	45
3.1	Le mouvement des chromosomes durant la mitose	45
3.2	Le mécanisme d'alignement des chromosomes : de l' <i>in silico</i> à l' <i>in vivo</i>	45
3.3	Modéliser la mitose : jusqu'à quelle précision ?	45
A	Annexes	47
A.1	Annexe 1 : bla bla bla bla	47
	Bibliographie	49

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



Source code used to generate this thesis is freely available at <https://github.com/hadim/thesis> (free as in freedom not as in a beer!).

1

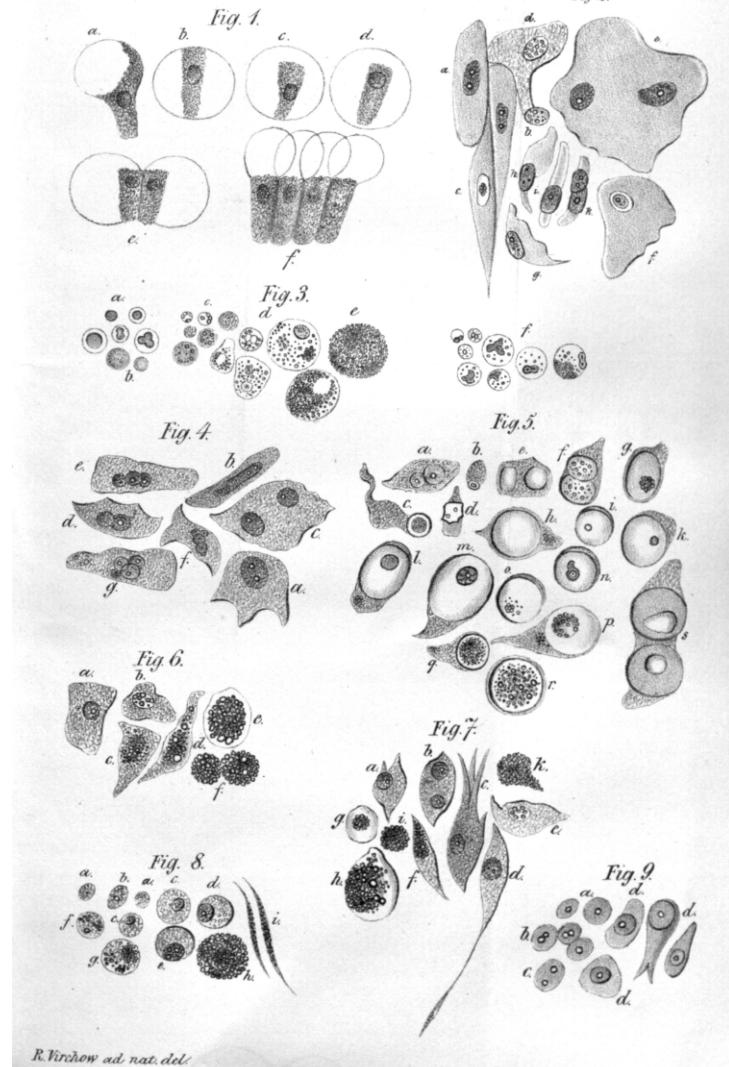
Introduction

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.

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 tel que la découverte de l'ADN (Watson et al., 1953), l'apparition de la biologie moléculaire ainsi que la création de microscope toujours plus précis.



R. Virchow ad nat. del.

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

Ce travail de thèse a pour objectif l'étude d'une phase tout à fait cruciale durant la vie d'une cellule: le moment où elle se divise. Cette étape, appelé 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. Ainsi que son rôle fondamentale dans la compréhension du cancer; qui n'est autre qu'un ensemble de maladie 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 comprendre de quoi est composée 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 passe bien. L'ensemble de ces processus qui dictent 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'événement varie de manière considérable d'une cellule à une autre. Le cycle cellulaire dépend de l'identité de la cellule (principalement défini par son matériel génétique) ainsi que son contexte écologique; c'est à dire le milieu environnant dans lequel elle se trouve.

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

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

- une phase de croissance (**phase G1**) durant laquelle la cellule va augmenter sa taille ainsi que son volume cellulaire. C'est aussi durant cette période qu'elle va synthétiser 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 crucial pour le maintien de la stabilité génétique. En effet chacun des nucléotides (allant de quelques milliers à plusieurs milliard selon le type de cellule) doit être dupliqués avec une grande précision afin que les deux cellules filles se voit transmettre la même information génétique.
- une 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 elle possède un système de blocage du cycle cellulaire (aussi appelé «checkpoint» ou «point de contrôle») qui permet de retarder l'entrée en mitose en cas de problème de réPLICATION de l'ADN apparu en phase S.
- 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

Il est important de souligner que dans la réalité, il existe autant de cycle cellulaire différent qu'il existe de type de cellule. Donc malgré la conservation de certains mé-

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

D'une manière plus générale on peut aussi souligner que l'un des enjeux de la biologie cellulaire aujourd'hui est de comprendre quelle part des mécanismes étudiés est conservé entre différents type cellulaire et quelle part est spécifiques de l'organisme étudié.

La dernière phase du cycle cellulaire est donc la mitose, c'est à dire le moment où une cellule va devenir deux cellules.

1.2 La mitose : une étape du cycle cellulaire

La dernière étape du cycle cellulaire est la mitose. Durant cette étape la cellule mère va se diviser en deux cellules filles. Tous les mécanismes précédent 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 appelé 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 former le 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 le processus peuvent être à l'origine de cellule possédant un nombre défectueux de chromosomes (cellule aneuploïde). Par ailleurs 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, appelé centrosome chez les eucaryotes supérieurs, se séparent et commencent à migrer vers leurs extrémités respectives afin de former le fuseau mitotique.

Note: certains fuseaux mitotiques peuvent se former sans pôles (« *acentrosomal spindle formation* » en anglais). Ce type de division très particulière n'est pas discuté dans ce travail.

- la **prométaphase** : la membrane nucléaire se désassemble dans le cas d'une mitose ouverte (Boettcher and Barral, 2013) tandis qu'elle reste intact dans les mitoses fermées (répandu chez les protistes et organismes unicellulaires). Les chromosomes s'attachent aux microtubules par l'intermédiaire d'une structure protéique qui s'assemble au même moment au niveau du centromère des chromosomes: le kinétochore.
- la **métaphase** : les chromosomes alors attachés aux pôles par l'intermédiaire des microtubules viennent alors se positionner à l'équateur de la cellule pour former la plaque métaphasique. Cette étape cruciale de la mitose possède des mécanismes de détections des chromosomes mal attachés afin de retarder le passage à l'étape suivante si besoin.

La transition métaphase/anaphase possède un point de contrôle appelé le SAC (Spindle Assembly Checkpoint) qui permet à la cellule d'arrêter la mitose en cas d'attachement incorrect (Musacchio and Salmon, 2007). L'anaphase commence au moment où le complexe Cdc2-Cyclin B s'inactive par l'activation de l'APC (Anaphase Promoting Complex). L'APC est une ubiquitin ligase capable de dégradé la Cyclin B (Sivakumar and Gorbsky, 2015).

- l'**anaphase** : durant l'anaphase A, le complexe cohésine reliant les chromatides soeurs est dabord dégradé (Oliveira et al., 2010). Ensuite chaque chromatide est «tiré» vers son pôle respectif par la dépolymérisation des microtubules qui les attachent tandis que durant l'anaphase B, le fuseau mitotique s'allonge, éloignant alors les pôles et les chromosomes loin du centre de la cellule. On notera que ces deux phases peuvent être distinctes ou pas selon le type de cellule étudié.

- la **télophase** : les microtubules attachant les kinétochores se désagrègent, les chromosomes se décondensent retournant à leurs états initiaux de brins d'ADN. L'enveloppe nucléaire se reforme dans le cas d'une mitose ouverte.
- la **cytokinèse** : à ce stade, la mitose est fini. Durant cette période, la cellule va alors se diviser grâce à la formation d'un sillon au niveau de la membrane cytoplasmique qui s'invagine jusqu'à «couper» la cellule mère en deux cellules filles.

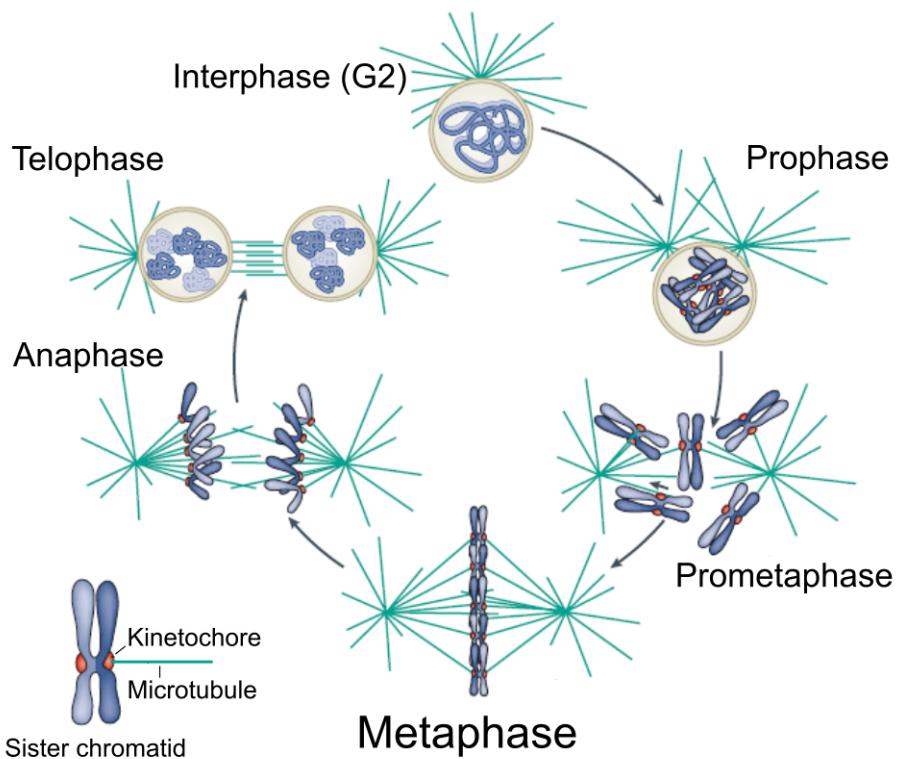


Figure 1.3: Les différentes étapes de la mitose (adapté de Cheeseman and Desai (2008))

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

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 un assemblage de protéine de très grande taille, possédant plusieurs dizaine de type de protéines différents (jusqu'à 80 chez les cellules humaine). L'assemblage se situe sur la partie centromérique des chromatides au niveau des variants d'histone H3 (appelé CENP-A) qui aide le kinétochore à s'associer à l'ADN.

Il est composé de deux régions (Figure 1.4) :

- **la plaque interne** 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, est responsable des interactions avec le fuseau mitotique, notamment les microtubules kinétochoriens. Cette région possède des sites d'ancrage pour les microtubules au kinétochore 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 (*S. cerevisiae*).



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

Le kinétochore se forme durant la prométaphase et joue plusieurs rôle important. En plus d'être un acteur essentiel dans le bon déroulement du point de contrôle de la transition métaphase/anaphase (le SAC), il a aussi un rôle structurel dans l'attachement entre le chromosome et les microtubules.

1.2.3 Les microtubules

Les microtubules sont 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 micromètre. Ils sont formés de dimères de tubuline, eux même composé de deux sous unités, la tubuline α et la tubuline β .

La formation d'un microtubule requiert un complexe protéique qui jouera le rôle de patron de construction, constitué de la γ tubuline. Celui-ci forme un anneau permettant la disposition de chaque protofilament tel que présenté Figure 1.5A. L'extrémité + est coiffé 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 et la dépolymérisation (voir Figure 1.5B). Les deux extrémités étant chargé différemment en GTP et GDP, elle possède une dynamique plus ou moins importante. On parle d'extrémité + pour celle chargée en GTP et donc très dynamique (coiffée par la tubuline β) et d'extrémité - pour celle chargée en GDP donc moins dynamique (coiffée par la tubuline α).

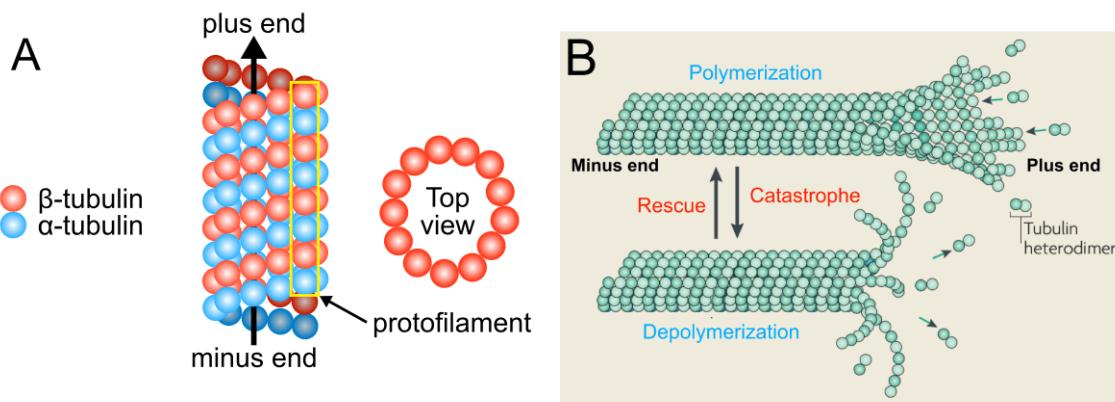


Figure 1.5: **A.** Schéma présentant l'organisation d'un microtubule. **B.** Les microtubules sont des structures hautement dynamique qui passent très souvent d'un état à l'autre (Walczak et al., 2010).

Les microtubules, et d'une manière plus générale l'ensemble des protéins du cytosquelette, jouent un rôle essentiel dans la cellule en lui conférant une réalité physique. En effet ces protéines de structure permettent le maintien de la forme tridimensionnelle et participent aussi au processus de migration des cellules. C'est ainsi qu'il est possible d'apprécier la grande diversité de forme 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 tel que des vésicules ou autre grande protéines. En effet leur polarité et leur grande rigidité permettent un déplacement sur de longue distance et de manière dirigée. Par exemple les neurones contiennent un grand nombre de microtubules nécessaires au déplacements de nombreuses protéines soit vers les prolongements cellulaires ou bien vers le corps cellulaire.

Le transport est rendu possible grâce à des protéines associées aux microtubules (appelé Microtubules-Associated Proteins ou MAP en anglais). Par exemple les moteurs moléculaires sont des MAP très connus et étudiés. Parmi eux les kinésines se déplacent vers l'extrémité + tandis que les dynéine se déplacent vers l'extrémité -.

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

Pour finir on soulignera leur importance capitale durant la mitose car c'est eux qui forment l'essentiel du fuseau mitotique. En plus d'un rôle structurelle durant la division cellulaire, ils participent aussi de manière active en fournissant une partie de l'énergie nécessaire au déplacement des chromosomes.

Bien que les microtubules soit des structures très dynamique, un grand nombre de molécules et de protéines sont capable de modifier cette dynamicité. Notamment une famille de protéine est connu pour induire la dépolymérisation des microtubules pendant la mitose.

1.2.4 Les kinésines dépolymérisatrice de microtubule

Les premières études sur cette famille de kinésine ont commencé dans les années 1990 (voir cette excellente revue à propos de cette famille de kinésine par Claire E. Walczak (Walczak et al., 2013)). La kinésine 13 fut la première à être décrite comme une kinésine dépolymérisatrice de microtubule. Par exemple, la déplétion de la kinésine 13 dans des extraits d'oeufs de *Xenopus* (appelé XKCM1) a pour effet

d'agrandir la taille des microtubules qui présentent par ailleurs un taux de catastrophe plus élevé (Walczak et al., 1996). Par la suite la kinésine 13 a été retrouvé chez un grand nombre d'autre organismes pour lesquel il a été montré un rôle dans la destabilisation des microtubules (Ganem et al., 2005; Maney and Hunter, 1998).

Étonnement personne ne retrouva la kinésine 13 chez les champignons et c'est au début des années 2000 que la kinésine 8 commença à être décrite chez la levure. Chez la levure à fission (*Schizosaccharomyces pombe*), la déplétion de la kinésine 8 (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 localisé à l'extrémité + des microtubules kinétochoriens et que sa délétion entraîne un allongement du fuseau mitotique, un décentrage des chromosomes ainsi qu'un délai du démarrage de l'anaphase dû à l'activation du point de contrôle de la transition métaphase/anaphase (le SAC) (Goshima et al., 2005; Jaqaman et al., 2010; Mayr et al., 2007; Stumpff et al., 2008; Wargacki et al., 2010).

Une étude phylogénique sur les kinésines (Wickstead and Gull, 2006) suggère que tout les eucaryotes possèdent au moins un gène codant pour une kinésine parmi la kinésine 8 et la kinésine 13. 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 fondamentale des kinésines dépolymérisatrices dans l'activité des microtubules des cellules eucaryotes.

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.

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

Si les protéines dépolymérisatrices influent le comportement de l'attachement entre le microtubule et le kinétochore, elles ne sont pas responsable de l'attachement. Celui-ci dépend de protéines spécifiques au kinétochore qui permettent l'ancrage du microtubule et ainsi que le maintien de l'attachement.



Figure 1.6: Vue 3D de la kinésine 13 (MCAK) et de la kinésine 8 (Kif18a) chez des cellules humaines. La troisième vue montre une superposition des deux protéines. (Walczak et al., 2013)

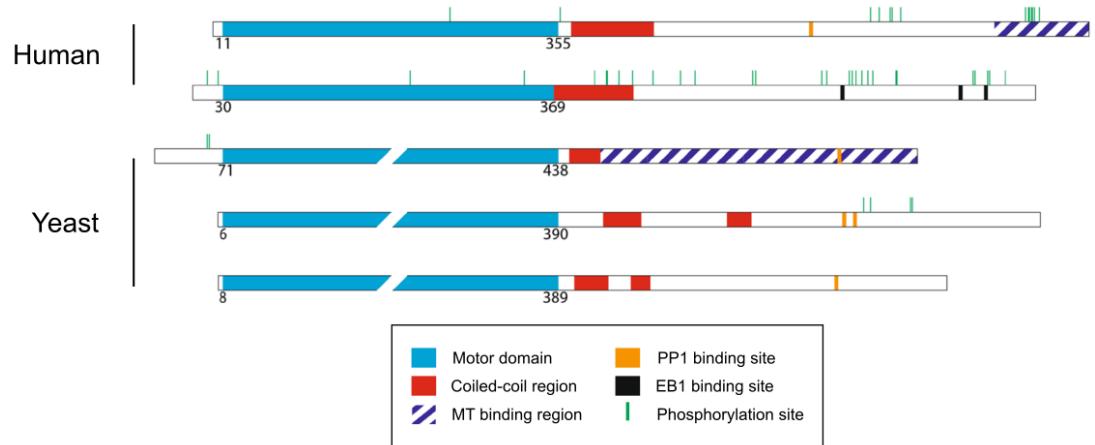


Figure 1.7: Vue schématique des domaines protéiques composant la kinésine 8 chez la cellule humaine, la levure à bourgeon et la levure à fission (Messin and Millar, 2014).

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 appelé le kinétochore. L'attache se situe au niveau de la plaque externe du kinétochore et est principalement réalisé grâce au complexe NDC80 (DeLuca et al., 2002, 2006; McCleland et al., 2004; Wigge and Kilmartin, 2001).

Ce complexe est un hétérotetramère composé de quatre protéines (voir Figure 1.8A): Ndc80, (Hec1 chez les humains), Nuf2, Spc24 et Spc25 (Wei et al., 2005). La tête composé de Ndc80-Nuf2 accroche le microtubule tandis que la tête Spc25-Spc24 attache la plaque externe du kinétochore.

Chez la levure un autre complexe protéique, appelé Dam1 ou DASH, a été décrit comme participant à l'attachement KT-MT. Ce complexe forme un oligomère autour du MT en forme d'anneau partiel ou complet (Miranda et al., 2005; Westermann et al., 2006).



Figure 1.8: **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. et son équipe ont proposé un modèle continu de l'attachement des microtubules au kinétochore (Zaytsev et al., 2014). En effet les site d'attachement ne sont plus vus comme un espace bien défini qu'il est possible de compter mais comme une surface sur laquelle les attachements se font de manière

non exclusive (voir Figure 1.8B).

1.2.6 Les différents type d'attachements

L'association des kinétochores soeurs avec leurs pôles respectifs s'appelle un attachement amphitélisque, on parle aussi de chromosomes biorientés (voir Figure 1.9). 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 1.9):

- **monotélique** : seulement un des deux kinétochores est attaché à aux MTs provenant tous du même pôle.
- **syntélique** : les deux kinétochores sont associés à des MTs provenant du même pôle.
- **mérotélique** : un kinétochore est associé à des MTs provenant des deux pôles.



Figure 1.9: Les différents types d'attachements des kinétochores aux microtubules.

Un attachement incorrect des kinétochores durant l'anaphase peut entraîner une perte de chromosome et par la suite la mort cellulaire ou bien la dégénérescence d'un tissu. La cellule a donc développé des mécanismes robuste de correction.

D'abord de manière purement géométrique suite au processus de réPLICATION et de condensation, les deux kinétochores soeurs sont placés face à face 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. montra dans un expérience de micromanipulation des chromosomes de spermatocyte de sauterelle, que l'attachement KT-MT est par nature instable et qu'il se stabilise à mesure que la tension augmente (Nicklas et al., 1982).

Par ailleurs des expériences de laser ablation sur des chromosomes en métaphase (Skibbens et al., 1995) ont montré que les deux chromatides soeurs se déplacent vers leurs pôles respectif après avoir ablater leur région centrale, ce qui indique que l'attachement d'un microtubule à un kinétochore produit une force dans la direction du pôle qui attache le microtubule. Par conséquent un chromosome amphitélique, correctement attaché, est nécessairement sous tension tandis que les attachements monotéliques ou syntéliques doivent subir une tension plus faible. Ainsi les attachements incorrects devraient être éliminé avec le temps tandis que les attachements corrects auraient tendance à être maintenu 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 la protéine kinase appelé Aurora B, localisé au centre du centromère. La phosphorylation de certaine protéines du kinétochore par Aurora B réduit l'affinité de l'attachement (DeLuca et al., 2006). Comme présenté sur la Figure 1.10, si la distance entre les deux kinétochores est grande, dû à une tension élevé, Aurora B n'a pas accès aux protéines du kinétochore et ne pourra donc pas destabiliser l'attachement (Tanaka et al., 2002).

Ces mécanismes ne peuvent néamoins pas corrigés les attachements mérotéliques. En effet les deux kinétochores étant partiellement attachés aux deux pôles, le fuseau exerce quand même une tension à travers le centromère. Le déséquilibre de tension se situe alors au niveau du kinétochore. Bien que ces mécanismes de correction soit encore mal compris, l'un d'entre eux semble impliqué Aurora B (Cimini et al., 2006). Un autre mécanisme propose une correction structurelle en détectant le déséquilibre de force présent en anaphase sur le kinétochore mérotélique par l'intermédiaire d'une protéine appelé Ase1 (Courtheoux et al., 2009).

Les mécanismes en charge de l'intégrité et de la correction des attachements des chromosomes prennent du temps. La cellule a donc développé un point de contrôle

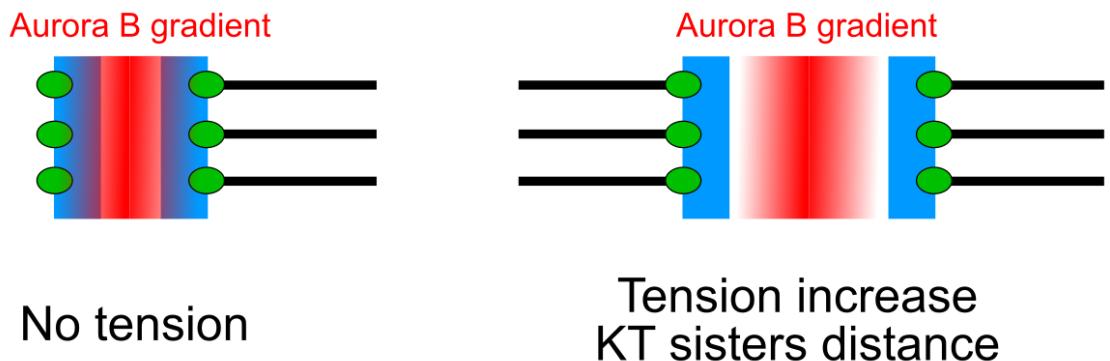


Figure 1.10: Le mécanisme de destabilisation de l'attachement KT-MT. Quand les deux kinétochères soeurs sont éloignées (schéma de droite), Aurora B ne peut pas atteindre les protéines du kinétochore (en vert) et donc destabiliser l'attachement KT-MT.

afin de mettre la mitose « en pause » avant l'entrée en anaphase, afin que tous les attachements puissent être corrigés.

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

La métaphase correspond au moment où l'ensemble des chromatides sont encore attachées entre elles et alignées au milieu du fuseau mitotique entre les deux pôles. Voir par exemple ces deux photos de microscopie à fluorescence de deux cellules différentes en métaphase (Figure 1.13).

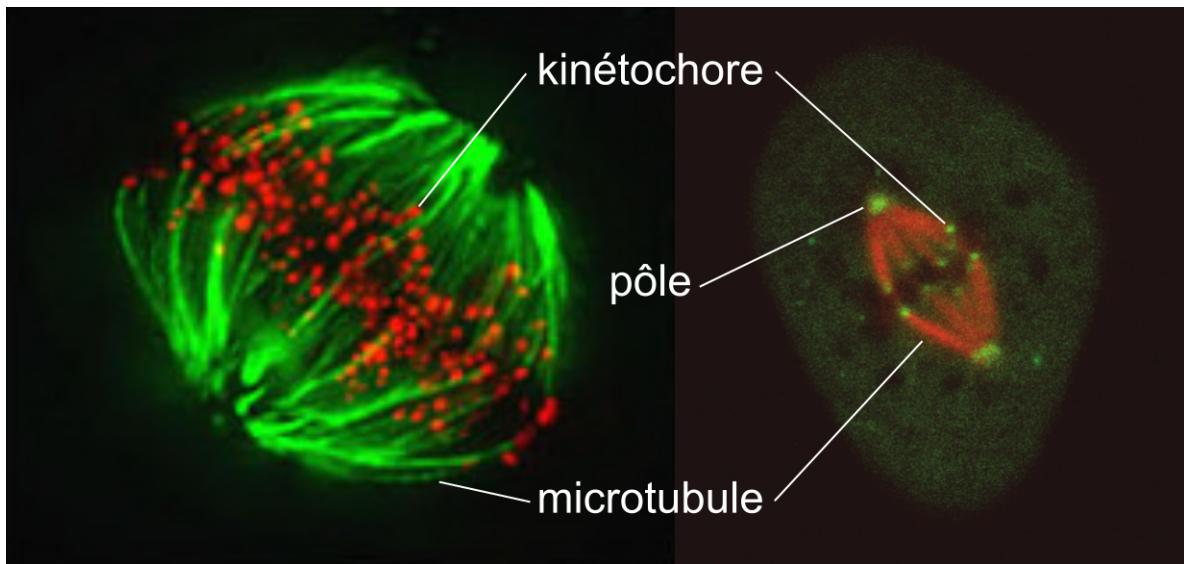


Figure 1.11: Deux cellules en métaphase (cellule HeLa à gauche et cellule Ptk1 à droite). Pour les deux cellules les kinétochores de l'ensemble des chromosomes sont marqués respectivement en rouge et vert tandis que les microtubules sont marqués respectivement en vert et rouge. (Huang et al., 2008; Wan et al., 2012)

1.3.1 La congression des chromosomes

L'étape d'alignement des chromosomes s'appelle la congression et a lieu durant l'étape précédant la métaphase, la prométaphase. Une cellule passe donc du temps et dépense de l'énergie à regrouper et aligner ces chromosomes au milieu du fuseau mitotique.

En début de prométaphase les chromosomes initialement non attachés commencent à se bi-orienter. C'est à ce moment qu'ils vont subir une série de mouvement de va et vient (aussi appelé oscillation) 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'oeuvre en microscopie à fluorescence en marquant les kinétochores et les microtubules d'une cellule humaine par exemple (Figure 1.12).

TODO: REVIEW DE L ALIGNEMENT et des différent mecanisme

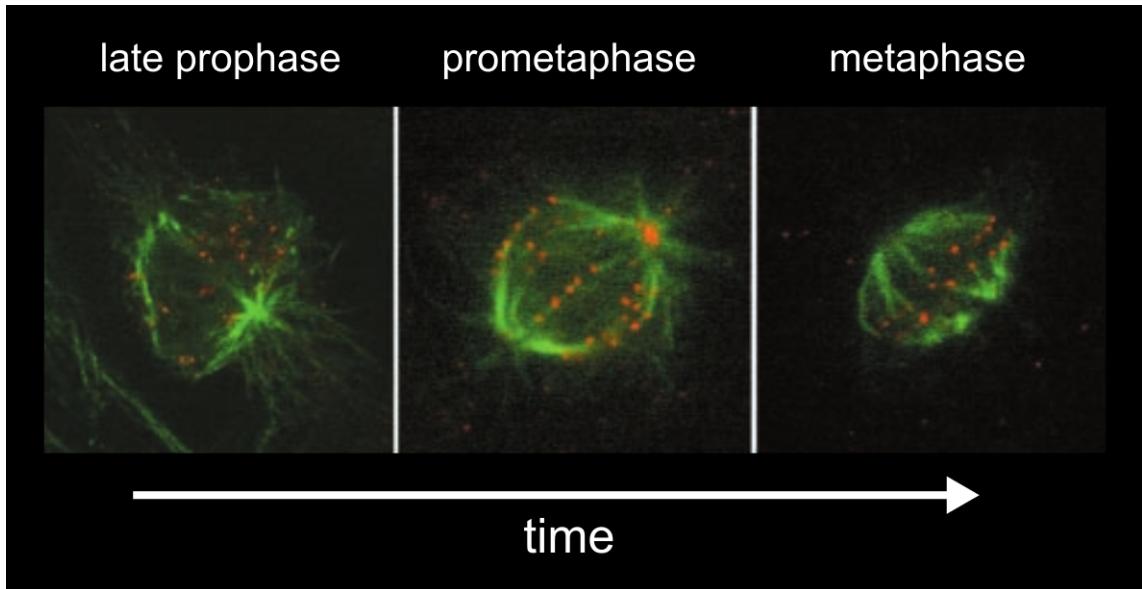


Figure 1.12: Cellule humaine (RPE1) en début de mitose. Les kinétochères (en rouge) sont alignés à la fin du processus durant la métaphase. On peut deviner les deux pôles du fuseau en suivant où les microtubules (en vert) convergent. (DeLuca et al., 2002)

1.3.2 Le fuseau mitotique : un objet sous contrainte

L'une des premières descriptions de l'oscillation des chromosomes a été faite en 1993 par Skibbens et al. (Skibbens et al., 1993).

Pour donner une idée des forces en jeu, Nicklas a mesuré que la force maximale que pouvait un chromosome était de l'ordre de 700 pN (Nicklas, 1983), ce qui correspond à une force approximative de 10-15 pN par microtubule. D'autre propriété biophysique ont aussi été mesurées pour la première fois au début des années 2000 comme par exemple la constante d'élasticité d'un chromosome (Marshall et al., 2001).

cité dumont et son science -> In an attempt to identify the magnitude of tension exerted on pairs of sister kinetochores oscillating between the spindle poles, where one sister moves poleward (leading) and the other moves away from its pole (trailing), recent studies used probes to mark the pole-proximal and the centromeric ends of pairs of sister kinetochores undergoing directional instability in metaphase spindles of cultured vertebrate cells [20]. The authors found that the poleward-moving sister kinetochore is compressed, whereas its trailing sister is stretched, and attributed this finding to the presence of an elevated friction at the site of active force generation (i.e. at the poleward-moving sister kinetochore).

rôle de ndc80 et dam1 dans la génération de la force : (Joglekar et al., 2010)

TODO: point ordigne et propriété biophysique

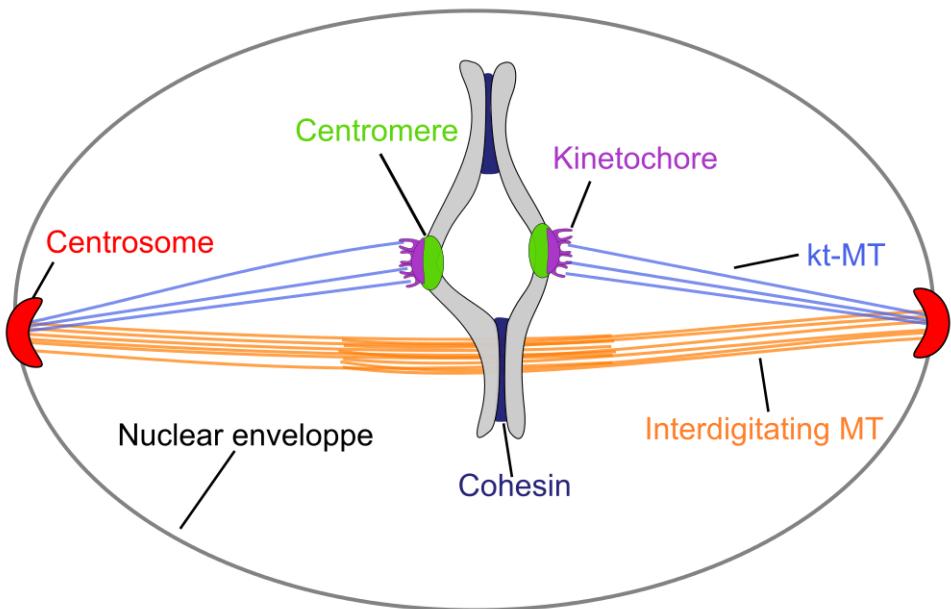


Figure 1.13: Schéma d'un fuseau mitotique (mitose fermé).

1.3.3 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 que la fidélité de tout les attachements soit garantie (voir Lara-Gonzalez et al. (2012) pour une revue). Quand un attachement est incorrect (voir Figure 1.9 pour les attachements corrects/incorrects), il active le SAC qui bloque le cycle cellulaire.

Jusqu'à la métaphase les chromatides soeurs sont maintenues entre elles par un complexe protéique appelé la cohésine (Nasmyth and Haering, 2009). L'entrée en anaphase active un mécanisme de dégradation de la cohésine. Une fois le lien entre les chromatides soeurs disparu, chacune des chromatides va migrer en direction du pôle vers lequel elle est attachée, c'est l'anaphase.

Par défaut le SAC est actif et inhibe la dégradation de la cohésine. Lorsque tout les kinétochores sont attachés de manière stable, alors le SAC se désactive et une cascade métabolique dégrade le complexe cohésine.

Les kinétochores non-attachés génèrent un signal « on » à l’attention du SAC en recrutant un complexe protéique composé principalement de 4 protéines Mad2, BubR1, Bub3 and Cdc20 (Sudakin et al., 2001) appelé le « Mitotic Checkpoint Complex » (MCC) (Figure 1.14). Ce complexe est à ce jour connu pour être l’inhibiteur

principal de l'APC/C. L'APC/C est une E3 ubiquitine ligase qui cible des protéines du cycle cellulaire afin de les dégrader par protéolise (Pines, 2011). L'une des cibles de l'APC/C est la sécurine qui inhibe la protéine capable de cliver la cohésine appelé la séparase (Figure 1.14).

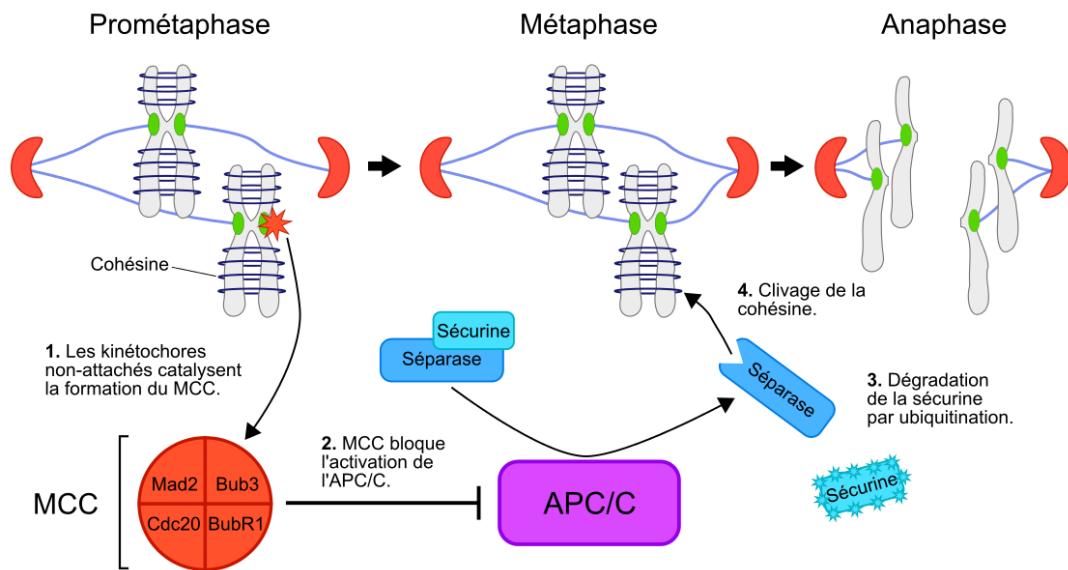


Figure 1.14: Le mécanisme d'action du SAC. Les chromosomes non-attachés catalyse la formation du MCC au niveau du kinétochore. Le MCC bloque l'activité de l'ubiquitine ligase APC/C. Une fois tout les kinétochères correctement attachés, l'APC/C dégrade la sécurine, ce qui active la séparase qui clive le complexe protéique de la cohésine.

La façon dont les kinétochères non-attachés recrutent le MCC implique un complexe réseau de protéine situé 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'équation différentiel. Bien que les modèles de réseaux métaboliques peuvent 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 mis en jeux 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 La modélisation : quésako ?

La modélisation est un vaste champs de recherche et il existe une grande variété de classe de modèle. Les expériences de modélisation effectué durant ce travail et d'une manière plus générale les modèles 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 jeux. Cependant certains phénomènes très complexe ne peuvent pas toujours être modélisés par cette approche. On utilise donc parfois d'autre classe de modèle (comme les modèles de « boites noires », non discutés ici). On notera qu'il est aussi possible appliquer une série d'approximation afin de réduire la compléxité du processus étudié et ainsi utiliser un modèle de connaissance, au prix d'une précision moins importante.

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 produisent par ces 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 1.15).

Il peut apporter une vision plus précise du processus étudié, notamment en chiffrant 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

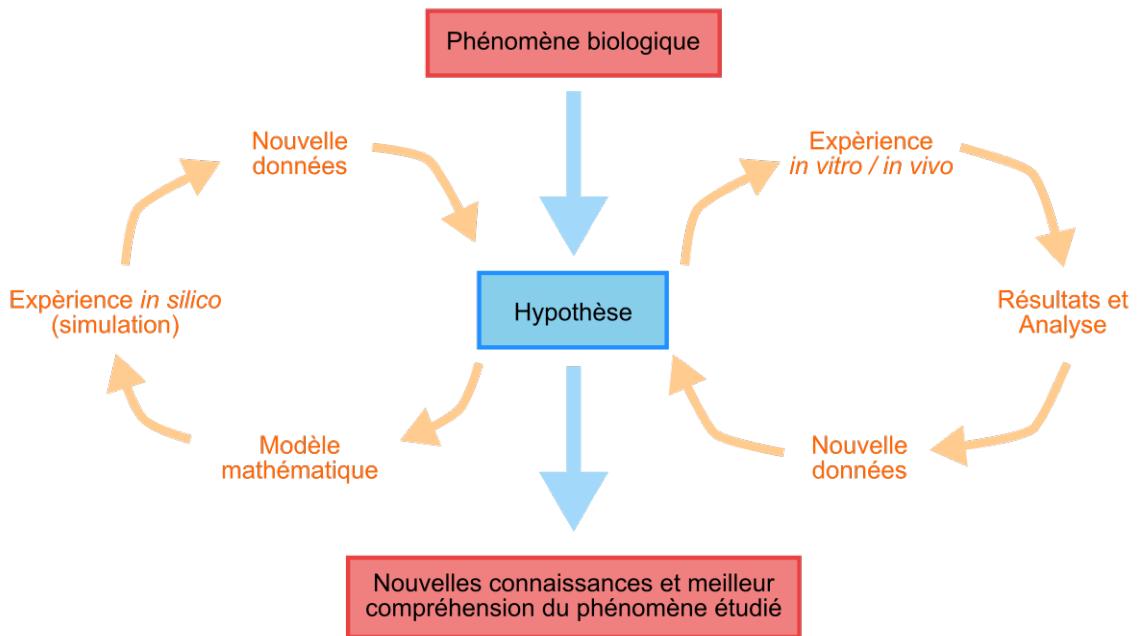


Figure 1.15: Schéma reproduisant un workflow expérimentale possible lors de l'étude d'un phénomène biologique par une approche de modélisation (adapté de Woelke et al. (2010)).

complexe à appréhender et à comprendre, est la continuité naturelle des modèles mentales que les scientifiques établissent par la déduction logique depuis toujours.

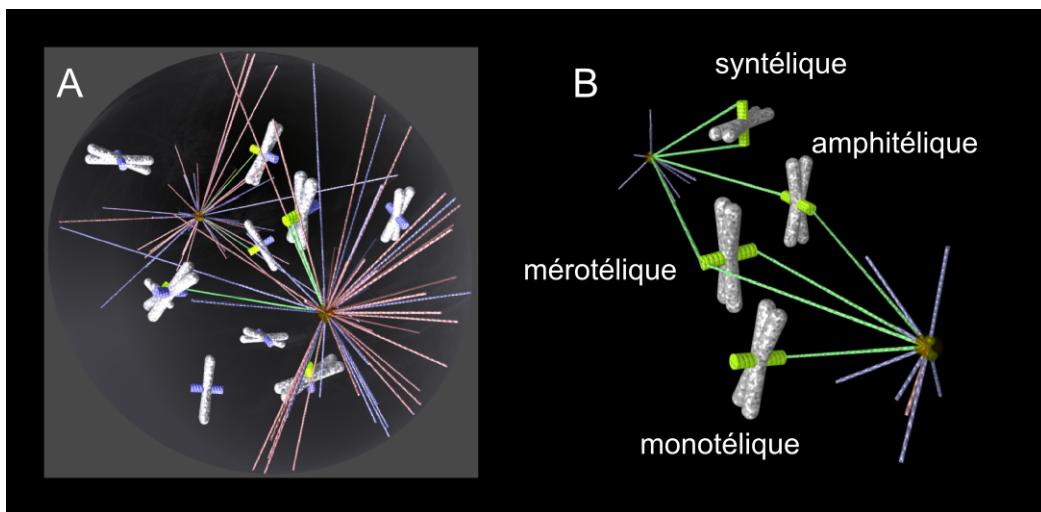
La mitose est un processus cellulaire d'une extrême compléxité en grande partie dû aux grand nombre de phénomènes mis en jeux dans un volume si petit. Il en résulte qu'il est à ce jour, en 2015, encore hors de notre portée de modéliser avec précision la mitose dans son intégralité. Chaque modèle s'applique 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 existant.

Pour finir on soulignera l'existance de nombreux modèles décrivant des phénomènes biologiques très spécifiques tel 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 certaine 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 L'assemblage du fuseau mitotique

L'assemblage du fuseau mitotique a été l'un des premiers processus mitotique à avoir été modélisé mathématiquement. Sa simplicité et la connaissance de la physique sous jacente en font un bon exemple d'utilisation de la modélisation mathématique dans la compréhension d'un phénomène biologique. (TOFO: A REFORMULER???)

Le modèle le plus répandu décrivant l'assemblage du fuseau mitotique est celui appelé « recherche et capture ». Durant la prométaphase, les microtubules s'assemblent des deux pôles du fuseau et vont « sonder » l'espace afin d'attacher chacun des kinétochores. 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 minute (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 pourrait être la présence d'un gradient de RanGTP autour des kinétochores (Figure 1.17). Une plus forte concentration de RanGTP stabiliserait les microtubules et les ferait croître en direction des kinétochore (loin des pôles). Des simulations numériques ont montré que ce biais spatiale lors du processus de recherche augmenterait la vitesse de capture (Wollman et al., 2005).

Cependant ce modèle encore trop naïf n'explique pas la précision avec laquelle

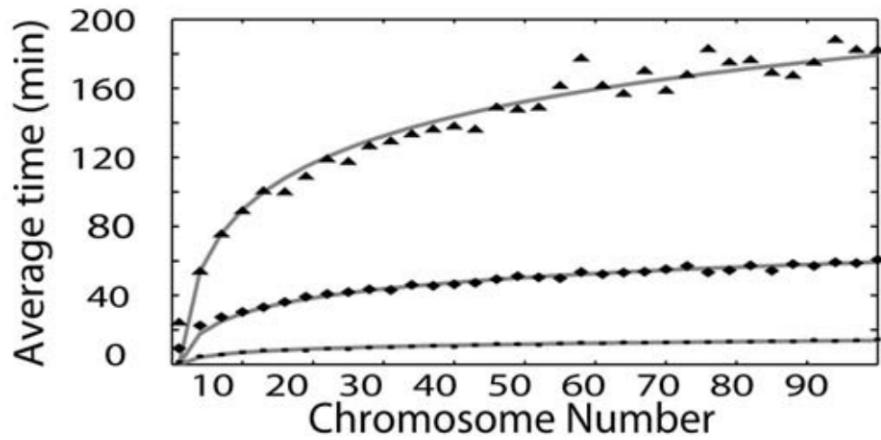


Figure 1.17: Temps moyen de capture de tout les chromosomes en fonction du nombre de chromosomes totales pour trois modèles différents *in silico* : modèle non-biaisé (recherche aléatoire) avec 1000 MTs (triangles), modèle biaisé (gradient de RanGTP) avec 250 MTs (losanges), modèle biaisé avec 1000 MTs (cercles) (Wollman et al., 2005).

Ille le fuseau attache les chromosomes, en évitant les attachements syntélique et mérotélique. En effet des simulations de « cherche et capture » aléatoire ont montré la présence de 65% d’attachement mérotélique et seulement 15% d’attachement amphitétrique (Paul et al., 2009).

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 soeur ferait face au pôle opposé et aurait donc une plus forte probabilité de s’attacher à lui (Figure 1.18A). 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’essaie et erreurs itératif. Au début les attachements syntétiques sont fréquents et disparaissent souvent (Lampson et al., 2004) jusqu’à que seulement les attachements amphitétriques soit conservés. Ceci est possible seulement si les taux d’attachement et de détachement dépendent de l’état d’attachement du kinétochore comme illustré Figure 1.18B. Ici aussi des simulations numériques ont montré que ce mécanisme réduit de manière très importante le nombre d’erreur 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 tel que Aurora B comme déjà discuté en 1.2.6.

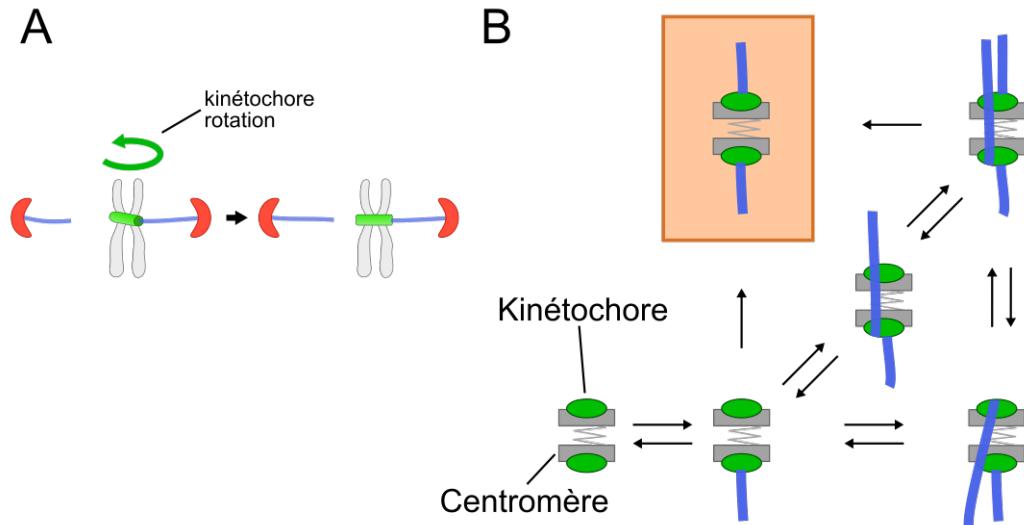


Figure 1.18: Deux mécanismes expliquant la fidélité des attachements durant le processus de « recherche et capture ». **A.** Mécanisme impliquant l'orientation du kinétochore soeur en réponse à un attachement monotélique. **B.** Mécanisme évolutif qui « sélectionne » l'attachement amphitélique (box couleur saumon) avec le temps en explorant différents états d'attachement.

1.4.3 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 en métaphase et anaphase est le mécanisme qui permet au kinétochore de maintenir son attachement à des microtubules qui dépolymérisent.

(Hill, 1985) (Joglekar and Hunt, 2002)

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

La levure *Schizosaccharomyces pombe* (Figure 1.19) est une levure à division symétrique aussi appelé « 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. L'histoire raconte que la levure à fission aurait été découverte dans un tonneau de bière périmée (*pombe* signifiant « dérivant de la bière »).

Depuis les années 50, les biologistes utilisent cette levure comme organisme modèle afin d'étudier le cycle cellulaire et notamment la mitose.

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 de Sanger. On estime que son génome contient environ 14 million de pairs de base codant pour ~5000 protéines et ~500 ARNs non-codant.

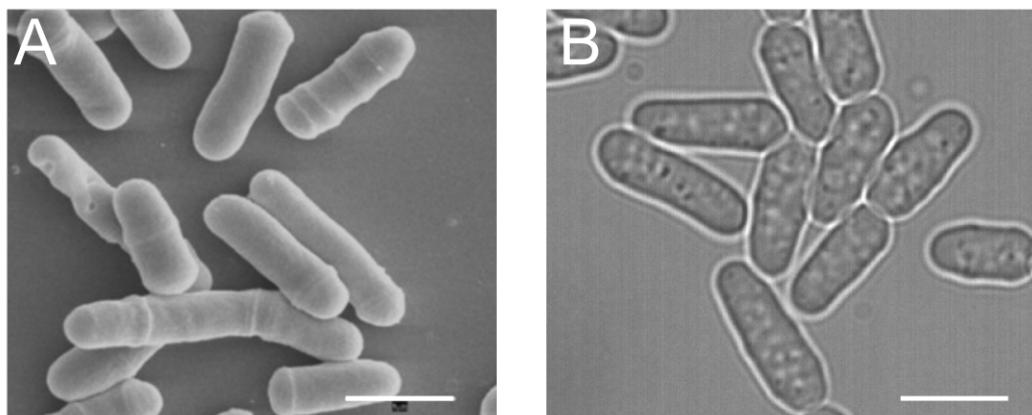


Figure 1.19: **A.** Vue en microscopie électronique à balayage de *S. pombe* (Morgan, 2007). **B.** Vue en microscopie optique à champ large en fond clair. La barre correspond à 8 μm dans les deux vues.

Son cycle cellulaire classique est composé d'une phase G1 brève de 20mn, d'une phase G2 longue de 2h et d'une phase de division (la mitose) qui dure une vingtaine de minute (Figure 1.20). 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

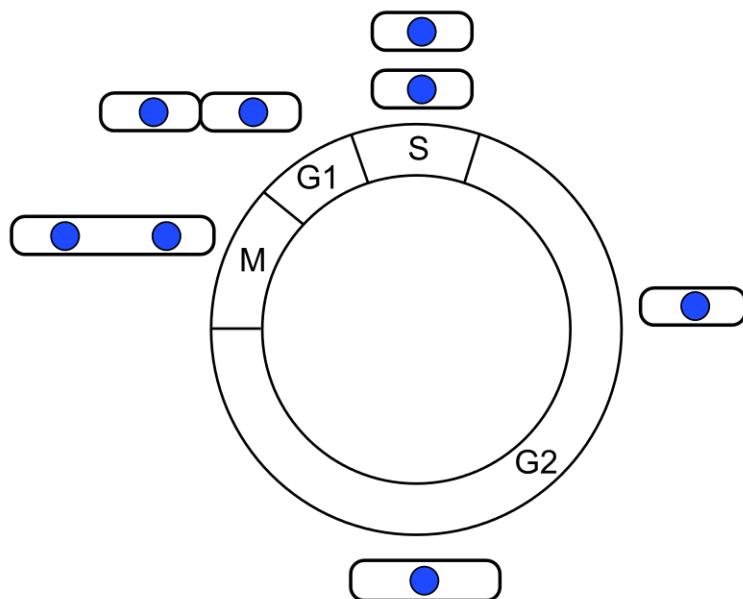


Figure 1.20: Schéma du cycle cellulaire de *S. pombe*.

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 fermé 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 2.5min, où le fuseau va s'allonger jusqu'à atteindre $\sim 2.5\mu\text{m}$; la métaphase où le fuseau reste stable grâce à un mécanisme de balance de force (Gay et al., 2012), $2.5\text{-}3\mu\text{m}$; l'anaphase A dure moins de 20s, l'allongement du fuseau est rapide, de l'ordre de 0.5 à $1\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fu et al., 2009); enfin l'anaphase B qui dure $\sim 10\text{min}$ où le fuseau va s'allonger jusqu'à atteindre la taille de $5\text{-}6\mu\text{m}$ avant de lancer la cytokinèse. La cytokinèse s'effectue par la contraction de l'anneau d'actine recruté au niveau du cortex de la cellule.

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

En 1996, une équipe a mis au point un système permettant la visualisation de la structure de la chromatine (Robinett, 1996). Cette technique appelée système LacO/LacI consiste en l'insertion d'un grand nombre de répétition (plusieurs centaines) de l'opéron *lac* (aussi appelé opéron lactose) au sein du génome. Le

gène *lacI*, auquel a été ajouté 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 1.21A). Ce système a été appliqué par une autre équipe en 2003 afin de visualiser la partie péri-centromérique, proche du kinétochore, du chromosome II de la levure à fission (Yamamoto and Hiraoka, 2003). Cette souche associé 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 1.21B).

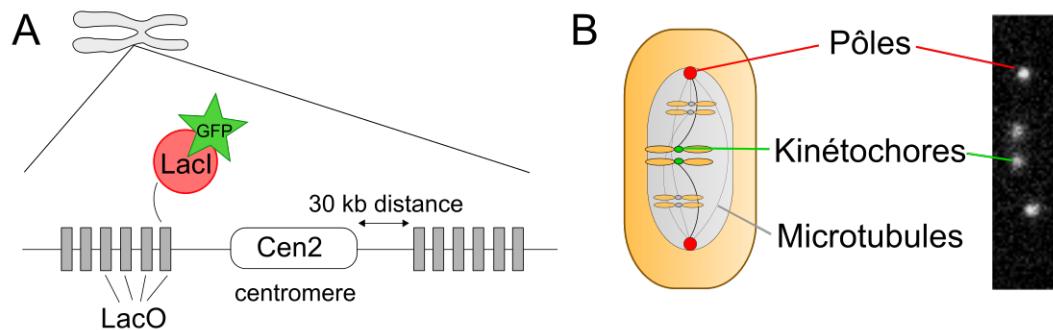


Figure 1.21: **A.** Système LacO/LacI pour la visualisation d'une région spécifique d'un chromosome à l'aide d'un marqueur fluorescent de type GFP. **B.** Schéma et vue en microscopie à fluorescence d'une cellule de levure à fission marqué pour les deux pôles du fuseau et les deux kinétochères du chromosomes II.

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.

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 force.

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, il se base en grande partie sur l'utilisation de souches de levure marqués pour les deux pôles du fuseau ainsi que les deux kinétochores du chromosome II (voir 1.5). La position des kinétochores est ensuite suivi à l'aide d'un microscope à fluorescence à champ large durant la mitose afin de suivre, à différente intervalle de temps, la position des kinétochores 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 reproducible 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 (et des statistiques bayésiennes ???) afin d'en extraire les principales propriétées.

Enfin un modèle mathématique de la mitose (Gay et al., 2012) a été utilisé afin de tester plusieurs hypothèses de mécanisme 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'oscillations 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 indispensables à l'alignement des chromosomes en métaphase.

Chez les eucaryotes supérieurs, la kinésine 8 contrôle la congression des chromosomes en régulant leur 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 implé-

mentant 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 local d’une protéine moteur au kinétochore peut fournir une information spatial à l’ensemble de fuseau afin de permettre l’alignement des chromosomes.

1	RESEARCH ARTICLE	63
2		64
3		65
4	Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression	66
5	independently of oscillations	67
6		68
7		69
8	Hadrien Mary ^{1,2,*} , Jonathan Fouchard ^{1,2,*} , Guillaume Gay ³ , Céline Reyes ^{1,2} , Tiphaine Gauthier ^{1,2} ,	70
9	Clémence Gruget ^{1,2} , Jacques Pécréaux ⁴ , Sylvie Tournier ^{1,2,†} and Yannick Gachet ^{1,2,‡}	71
10		72
11		73
12		74

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).

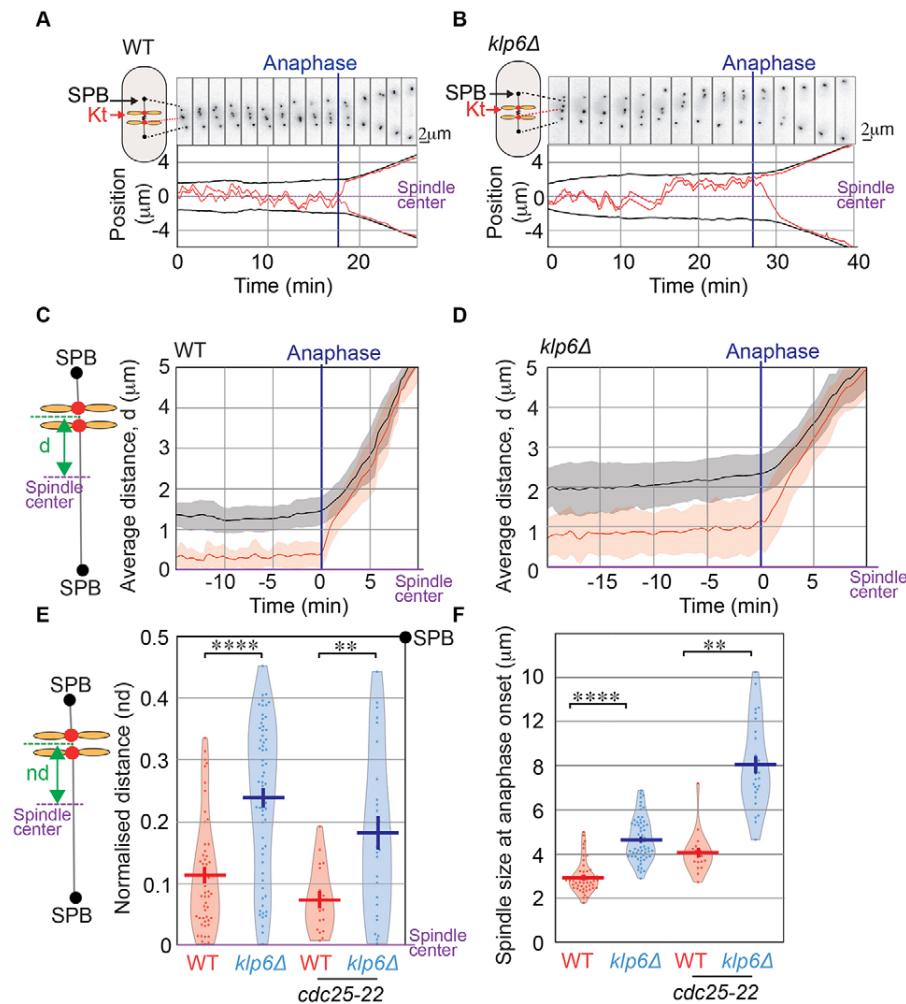


Fig. 1. The stability of sister kinetochore centering during metaphase depends on kinesin-8 activity. (A,B) Typical timelapse fluorescence images of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (marking the centromeric region of chromosome 2) and Cdc11-GFP (marking the spindle poles) during metaphase 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 of mitotic cells. Pink and grey 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 ($n=52$), *klp6Δ* ($n=63$), *cdc25-22* ($n=19$) and *cdc25-22 klp6Δ* ($n=26$) 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 ($n=52$), *klp6Δ* ($n=63$), *cdc25-22* ($n=19$) and *cdc25-22 klp6Δ* ($n=26$) cells. The plots in E and F show ?????? ** $P<0.01$, **** $P<0.001$ (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.

249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372

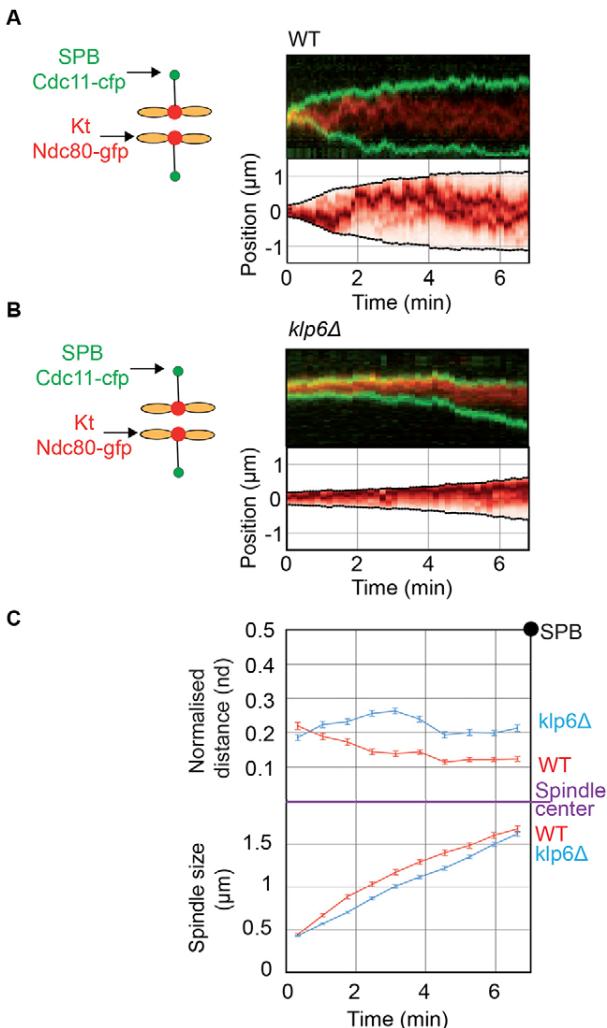


Fig. 2. Kinesin-8-dependent chromosome alignment is performed through an active process before metaphase. (A,B) Upper panel. Typical kymographs of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Ndc80-GFP (shown in red) and Cdc11-CFP (shown in green) from prophase to metaphase. Frames were taken every 5 s. 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

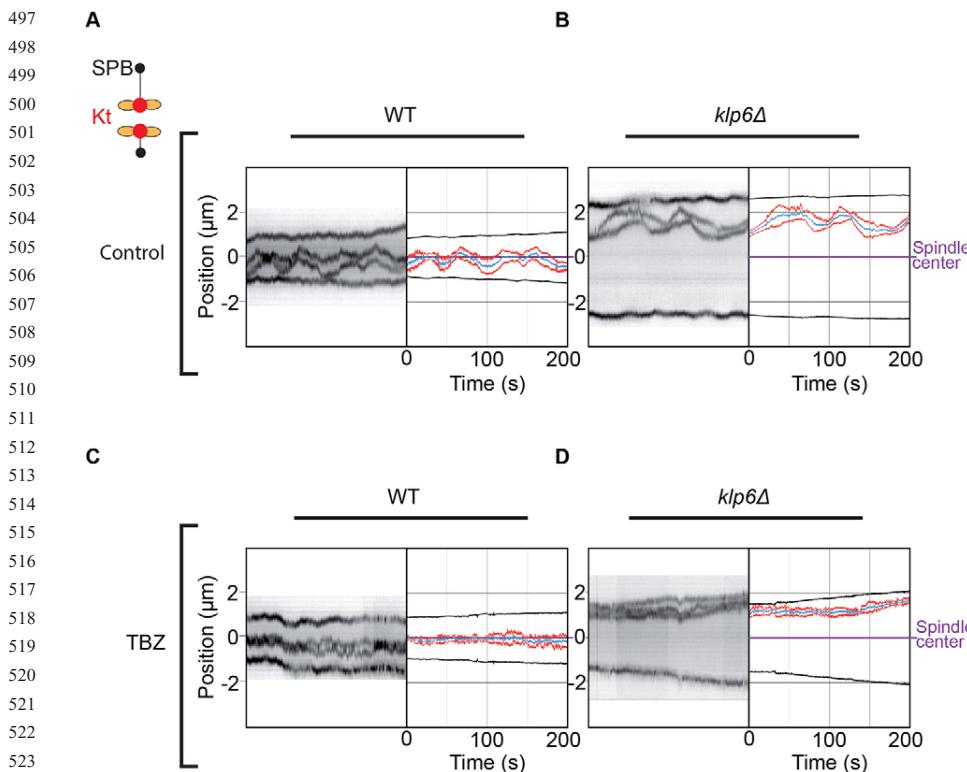


Fig. 3. Low doses of the MT-depolymerizing drug TBZ abolish chromosome oscillation but not centering. (A,B) Typical kymographs obtained at high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) and corresponding tracked trajectories of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Cen2–GFP (sister centromeres 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 μg/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 expected, *in vivo*, we found that the delay between the arrivals of the two sister chromatids at their respective pole was on average

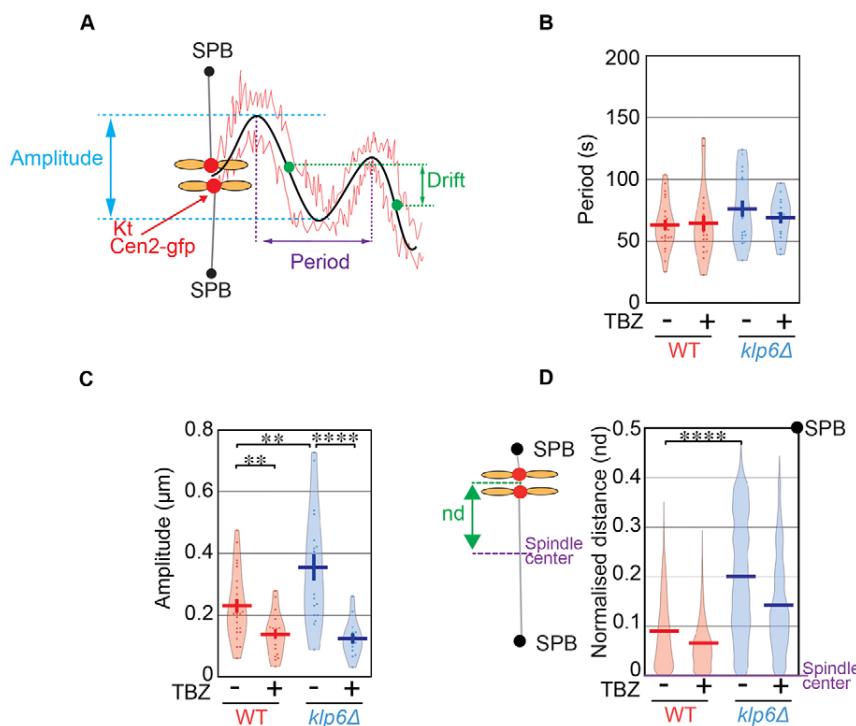


Fig. 4. Kinetochore oscillations are not required for the role of kinesin-8 in chromosome congression. (A) Schematic representation of oscillation periods, amplitudes and drifts in kinetochore trajectories. (B) Periods of kinetochore oscillations obtained with the Fourier transform method during metaphase in wild-type (WT) (control, $n=24$; TBZ, $n=19$) and *klp6Δ* (control, $n=18$; TBZ, $n=14$) cells in the presence or absence of 10 μg/ml of TBZ. (C) Amplitude of kinetochore oscillations obtained with the Fourier transform method during metaphase in wild-type (control, $n=24$; TBZ, $n=18$) and *klp6Δ* (control, $n=19$; TBZ, $n=14$) cells in the presence or absence of 10 μg/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, $n=73$, 460; TBZ, $n=63$, 390) and *klp6Δ* (control, $n=89$, 101; TBZ, $n=59$, 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 show ??????. **P<0.01, ***P<0.001 (Student's t-test).

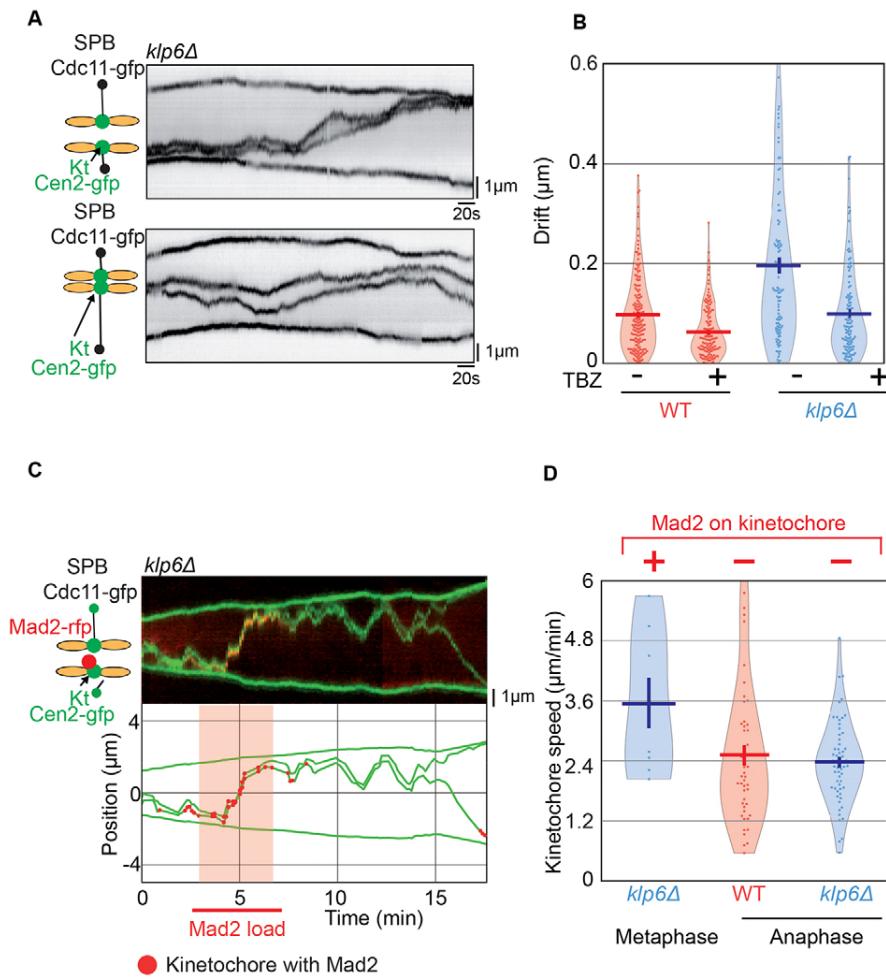


Fig. 5. Kinesin-8 mutants display imbalanced traction forces at kinetochores leading to chromosome detachment and instability in kinetochore positioning. (A) Typical kymographs obtained at a high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) of *klp6Δ* cells expressing Cen2–GFP (to mark sister centromeres) 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, $n=171$; TBZ, $n=141$) and *klp6Δ* (control, $n=104$; TBZ, $n=114$) 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 show ??????.

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 (proto-

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 protein that participates 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

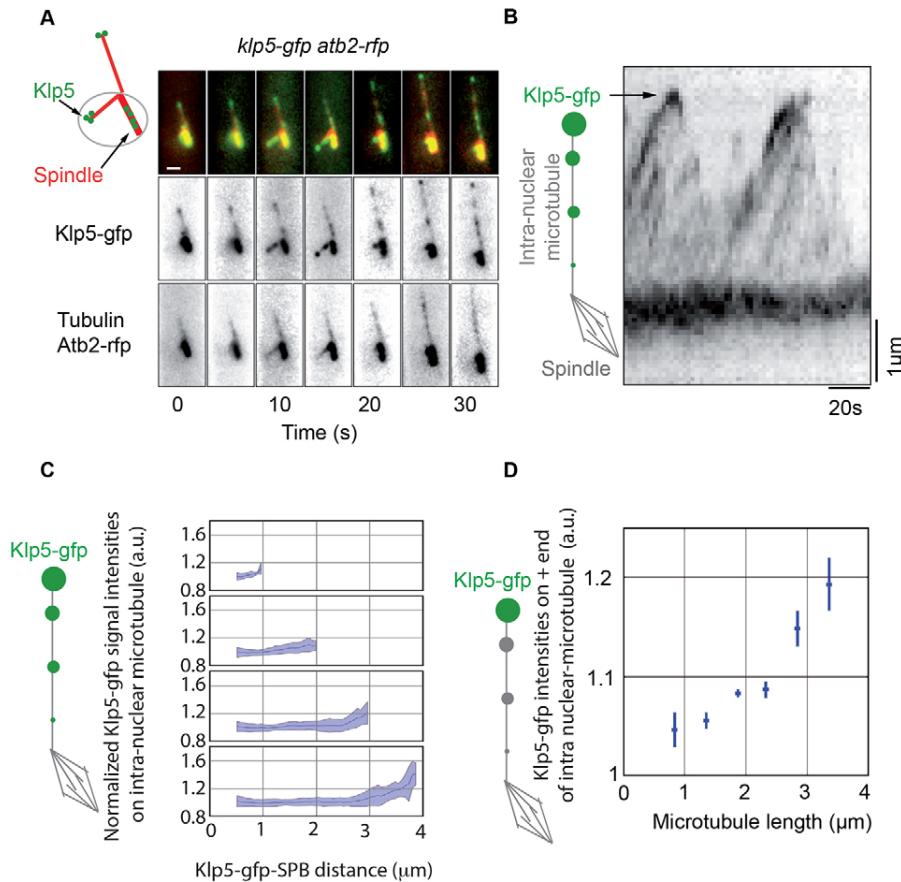


Fig. 6. Kinesin-8 accumulates at the tip of mitotic MTs in a length-dependent manner.

(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 exists 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

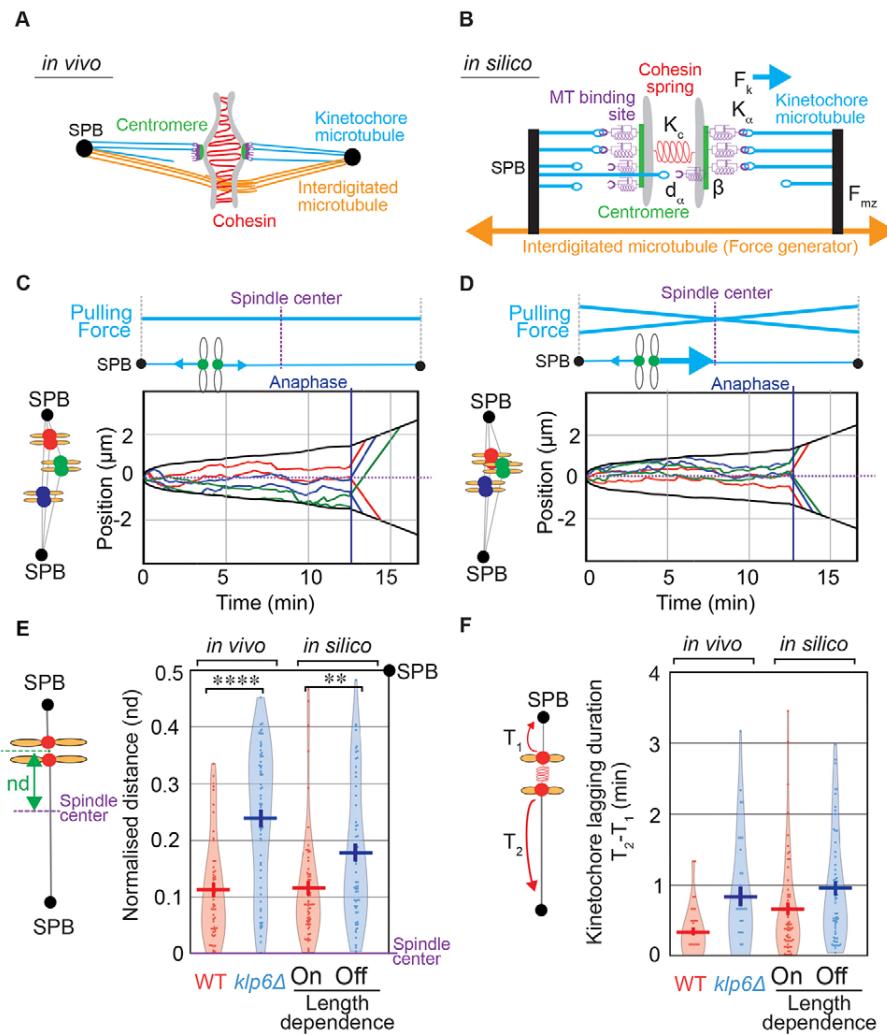


Fig. 7. A length-dependent pulling force centers kinetochores and prevents lagging chromosomes in a force-balance model. (A) Schematic representation of the metaphase spindle. The two SPBs (black) are linked by overlapping interdigitated MTs (orange). The chromosome (grey) is linked to the SPBs by its centromere regions (green). The three MT-binding sites located on each kinetochore (purple) are connected to the SPBs by kMTs (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 interdigitated 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 show ??????.

extract before mounting on an imaging chamber. The strains used in this study are listed in Table S2.

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 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

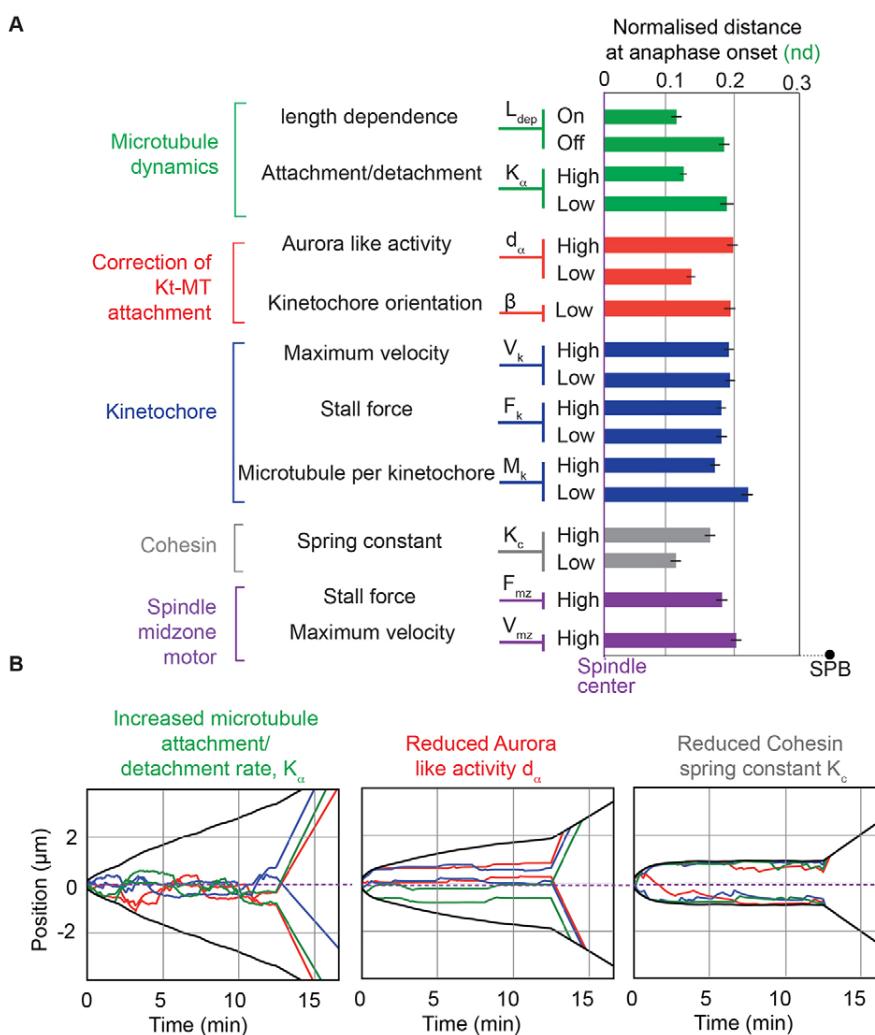


Fig. 8. Influence of several model parameters on kinetochore alignment. (A) Normalized distance between sister kinetochore position to the spindle center at anaphase onset. Several model parameters were either increased (High) or decreased (Low) as compared to the default value (Table S1) to study their influence on kinetochore alignment. Simulations were obtained with the length-dependent pulling force turned off. These parameters correspond to several functions within the spindle (i.e. MT dynamics, correction of kinetochore–MT attachment, **kinetochore**, cohesion and spindle midzone motors). (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.

(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 µg 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 of 600 nm**. To image Klp5-GFP on intra-nuclear MTs, images were acquired every 2 s with **3 Z 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 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

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.

1117 Kymographs

1118 Kymograph representations were performed with a custom Fiji macro
 1119 available upon request (https://github.com/hadim/fiji_tools/blob/master/
 1120 macros/AutoInstall/custom-macros.ijm#L45).

1121 Characterization of amplitudes and periods of oscillations

1122 Fast Fourier transform analysis

1123 To characterize kinetochore oscillations, we performed Fast Fourier
 1124 transform (FFT) analysis on each tracked trajectory of chromosome 2
 1125 (middle of the two Cen2-GFP spots; blue line in Fig. S3A). To convert the
 1126 power spectrum into an amplitude of movement (in μm), we normalized it
 1127 by the length of the signal and multiplied by two (half of the spectrum is
 1128 removed so energy must be preserved). Peaks were detected as local maxima
 1129 of the FFT curve. Peaks with frequency lower than 5×10^{-3} Hz were
 1130 excluded (high-pass filter). The peak of highest amplitude was used for the
 1131 characterization of the oscillatory movement.

1132 Detection of local maxima

1133 To characterize kinetochore oscillations, we first smoothed kinetochore
 1134 trajectories by fitting a spline function (red line in Fig. S3C). The middle
 1135 time point between the two peaks of two consecutive local extrema defines
 1136 the start of a semi-period and the following middle time point indicates the
 1137 end of the semi-period (Fig. S3C).

1138 Statistical analysis

1139 Errors mentioned in text and figures indicate the s.e.m. except when
 1140 specified. The violin plots used in this paper combines a standard box plot
 1141 with a density trace. Each circle represents a value in the dataset and the
 1142 horizontal bar represents the mean of the distribution. Statistical tests were
 1143 performed using a Student's *t*-test (Python library Scipy, `scipy.stats.ttest_ind`). Statistical significance is defined as follows: NS, $P > 0.05$,
 1144 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ and $****P < 0.0001$.

1145 Modeling

1146 The source code of the mitotic model (Gay et al., 2012) is available under an
 1147 open source license at https://github.com/bnoi/kt_simul.

1148 General assumption

1149 As previously described, Klp5 and Klp6 re-localize at the spindle midzone
 1150 during anaphase (West et al., 2001). Thus, in the simulations the length-
 1151 dependent mechanism described below was turned off during anaphase.

1152 Length-dependent pulling force

1153 In the initial model (Gay et al., 2012), the pulling force (F) applied on single
 1154 attachment sites follows a linear force–velocity relationship:

$$1155 F = \pi F_k \left(1 - \frac{v}{V_k} \right), \quad (1)$$

1156 where F_k and V_k are the stall force and the motor maximum velocity, v is the
 1157 speed of the attachment site and π is the attachment state (equal to 1 when the
 1158 site is attached to the correct pole, –1 when it is attached to the opposite pole
 1159 and 0 when it is detached).

1160 The length-dependent mechanism was implemented by adding a prefactor
 1161 L_{dep} to this pulling force:

$$1162 F = L_{\text{dep}} \pi F_k \left(1 - \frac{v}{V_k} \right). \quad (2)$$

1163 L_{dep} is calculated according to the actual distance between the attachment
 1164 site and its corresponding pole ($d_{\text{site-pole}}$) following a linear relationship:

$$1165 L_{\text{dep}} = 1 + \alpha(d_{\text{site-pole}} + d_{\text{mean}})$$

1166 Where α is a free parameter governing the strength of the relation between
 1167 the distance $d_{\text{site-pole}}$ and force magnitude. d_{mean} is the average *in vivo*
 1168 distance measured between the kinetochore attachment site and the pole
 1169 during metaphase. Finally, $d_{\text{site-pole}}$ is the actual distance between the
 1170 kinetochore attachment site and the pole. In this study we used $d_{\text{mean}}=1\text{ }\mu\text{m}$

1171 and $\alpha=0.2$. The value of α is optimized to reproduce kinetochore centering
 1172 as observed *in vivo*.

1173 Acknowledgements

1174 We would like to thank T. Toda and P. Tran for supplying strains and Thomas
 1175 Mangeat for critical reading of the manuscript.

1176 Competing interests

1177 The authors declare no competing or financial interests.

1178 Author contributions

1179 ??????????????

1180 Funding

1181 H.M. was supported by the Fondation pour la Recherche Medicale. J.F. was
 1182 supported by the plan Cancer 2009–2013 ‘Systems Biology’. This work was funded
 1183 by the ANR-blanc120601 ‘Chromocatch’ and the plan Cancer 2009–2013 ‘Systems
 1184 Biology’. J.P. was supported by the Centre national de la recherche scientifique
 1185 (CNRS), Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) and la
 1186 Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) (ATIP/Avenir). The microscopy equipment
 1187 was funded by the CNRS, l'ANR-blanc120601 and l'Association de la Recherche sur
 1188 le Cancer (ARC). Deposited in PMC for immediate release.

1189 Supplementary information

1190 Supplementary information available online at
<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.160465/-DC1>

1191 References

- 1192 Amaro, A. C., Samora, C. P., Holtackers, R., Wang, E., Kingston, I. J., Alonso,
 1193 M., Lampson, M., McAinch, A. D. and Meraldi, P. (2010). Molecular control of
 1194 kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations. *Nat. Cell Biol.*
 1195 12, 319–329.
 1196 Antonio, C., Ferby, I., Wilhelm, H., Jones, M., Karsenti, E., Nebreda, A. R. and
 1197 Vernos, I. (2000). Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on
 1198 the metaphase plate. *Cell* 102, 425–435.
 1199 Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Kwon, M., Mogilner, A. and
 1200 Scholey, J. M. (2004). Model for anaphase B: role of three mitotic motors in a
 1201 switch from poleward flux to spindle elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101,
 1202 15938–15943.
 1203 Cai, S., O'Connell, C. B., Khodjakov, A. and Walczak, C. E. (2009). Chromosome
 1204 congression in the absence of kinetochore fibres. *Nat. Cell Biol.* 11, 832–838.
 1205 Civelekoglu-Scholey, G. and Cimini, D. (2014). Modelling chromosome dynamics
 1206 in mitosis: a historical perspective on models of metaphase and anaphase in
 1207 eukaryotic cells. *Interface Focus* 4, 20130073.
 1208 Civelekoglu-Scholey, G., Sharp, D. J., Mogilner, A. and Scholey, J. M. (2006).
 1209 Model of chromosome motility in Drosophila embryos: adaptation of a general
 1210 mechanism for rapid mitosis. *Biophys. J.* 90, 3966–3982.
 1211 Civelekoglu-Scholey, G., He, B., Shen, M., Wan, X., Roscioli, E., Bowden, B. and
 1212 Cimini, D. (2013). Dynamic bonds and polar ejection force distribution explain
 1213 kinetochore oscillations in PtK1 cells. *J. Cell Biol.* 201, 577–593.
 1214 Courtheoux, T., Gay, G., Reyes, C., Goldstone, S., Gachet, Y. and Tournier, S.
 1215 (2007). Dynein participates in chromosome segregation in fission yeast. *Biol. Cell*
 1216 99, 627–637.
 1217 Courtheoux, T., Gay, G., Gachet, Y. and Tournier, S. (2009). Ase1/Prc1-
 1218 dependent spindle elongation corrects merotely during anaphase in fission
 1219 yeast. *J. Cell Biol.* 187, 399–412.
 1220 Desai, A., Maddox, P. S., Mitchison, T. J. and Salmon, E. D. (1998). Anaphase A
 1221 chromosome movement and poleward spindle microtubule flux occur at similar
 1222 rates in Xenopus extract spindles. *J. Cell Biol.* 141, 703–713.
 1223 Ding, R., McDonald, K. L. and McIntosh, J. R. (1993). Three-dimensional
 1224 reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast,
 1225 Schizosaccharomyces pombe. *J. Cell Biol.* 120, 141–151.
 1226 Dumont, S. and Mitchison, T. J. (2009). Compression regulates mitotic spindle
 1227 length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol.* 19, 1086–1095.
 1228 Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R. and Stuurman, N. (2010).
 1229 Computer control of microscopes using microManager. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 92,
 1230 14.20.1–14.20.17. Chapter 14, Unit 14.20.
 1231 Foethke, D., Makushok, T., Brunner, D. and Nédélec, F. (2009). Force- and
 1232 length-dependent catastrophe activities explain interphase microtubule
 1233 organization in fission yeast. *Mol. Syst. Biol.* 5, 241.
 1234 Funabiki, H. and Murray, A. W. (2000). The Xenopus chromokinesin Xkid is
 1235 essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow
 1236 anaphase chromosome movement. *Cell* 102, 411–424.
 1237 Gachet, Y., Reyes, C., Courtheoux, T., Goldstone, S., Gay, G., Serrurier, C. and
 1238 Tournier, S. (2008). Sister kinetochore recapture in fission yeast occurs by two
 1239 distinct mechanisms, both requiring Dam1 and Kip2. *Mol. Biol. Cell* 19,
 1240 1646–1662.

- 1241 Garcia, M. A., Koonrungsa, N. and Toda, T. (2002a). Spindle–kinetochore
1242 attachment requires the combined action of Kin I-like Klp5/6 and Alp14/Dis1-
1243 MAPs in fission yeast. *EMBO J.* **21**, 6015-6024.
1244 Garcia, M. A., Koonrungsa, N. and Toda, T. (2002b). Two kinesin-like Kin I family
1245 proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of
1246 anaphase A. *Curr. Biol.* **12**, 610-621.
1247 Gardner, M. K., Pearson, C. G., Sprague, B. L., Zarzar, T. R., Bloom, K., Salmon,
1248 E. D. and Odde, D. J. (2005). Tension-dependent regulation of microtubule
1249 dynamics at kinetochores can explain metaphase congression in yeast. *Mol. Biol.*
1250 **Cell** **16**, 3764-3775.
1251 Gay, G., Courtheoux, T., Reyes, C., Tournier, S. and Gachet, Y. (2012). A
1252 stochastic model of kinetochore-microtubule attachment accurately describes
1253 fission yeast chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **196**, 757-774.
1254 Grissom, P. M., Fiedler, T., Grishchuk, E. L., Nicastro, D., West, R. R. and
1255 Richard McIntosh, J. (2009). Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-
1256 end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo
1257 movement. *Mol. Biol. Cell* **20**, 963-972.
1258 Gupta, M. L., Jr, Carvalho, P., Roof, D. M. and Pellman, D. (2006). Plus end-
1259 specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in
1260 positioning the yeast mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* **8**, 913-923.
1261 Ikui, A. E., Furuya, K., Yanagida, M. and Matsumoto, T. (2002). Control of
1262 localization of a spindle checkpoint protein, Mad2, in fission yeast. *J. Cell Sci.* **115**,
1263 1603-1610.
1264 Jaqaman, K., King, E. M., Amaro, A. C., Winter, J. R., Dorn, J. F., Elliott, H. L.,
1265 McHedlishvili, N., McClelland, S. E., Porter, I. M., Posch, M. et al. (2010).
1266 Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere
1267 stiffness and microtubule depolymerases. *J. Cell Biol.* **188**, 665-679.
1268 Joglekar, A. P. and Hunt, A. J. (2002). A simple, mechanistic model for directional
1269 instability during mitotic chromosome movements. *Biophys. J.* **83**, 42-58.
1270 Joglekar, A. P., Bloom, K. S. and Salmon, E. D. (2010). Mechanisms of force
1271 generation by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Curr. Opin. Cell Biol.*
1272 **22**, 57-67.
1273 Kapoor, T. M., Lampson, M. A., Herget, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon,
1274 E. D., McEwen, B. F. and Khodjakov, A. (2006). Chromosomes can congress to
1275 the metaphase plate before biorientation. *Science* **311**, 388-391.
1276 Kitajima, T. S., Ohsugi, M. and Ellenberg, J. (2011). Complete kinetochore
1277 tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in
1278 mammalian oocytes. *Cell* **146**, 568-581.
1279 Kops, G. J. L., Saurin, A. T. and Meraldi, P. (2010). Finding the middle ground: how
1280 kinetochores power chromosome congression. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2145-2161.
1281 LaFountain, J. R., Jr, Oldenbourg, R., Cole, R. W. and Rieder, C. L. (2001).
1282 Microtubule flux mediates poleward motion of acentric chromosome fragments
1283 during meiosis in insect spermatocytes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 4054-4065.
1284 Magidson, V., O'Connell, C. B., Loncarek, J., Paul, R., Mogilner, A. and
1285 Khodjakov, A. (2011). The spatial arrangement of chromosomes during
1286 prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell* **146**, 555-567.
1287 Mayr, M. I., Hümmel, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G. and
1288 Mayer, T. U. (2007). The human kinesin Kif18A is a motile microtubule
1289 depolymerase essential for chromosome congression. *Curr. Biol.* **17**, 488-498.
1290 McIntosh, J. R. (2012). Motors or dynamics: what really moves chromosomes? *Nat.*
1291 *Cell Biol.* **14**, 1234.
1292 Mitchison, T., Wühr, M., Nguyen, P., Ishihara, K., Groen, A. and Field, C. M.
1293 (2012). Growth, interaction, and positioning of microtubule asters in extremely
1294 large vertebrate embryo cells. *Cytoskeleton* **69**, 738-750.
1295 Oliphant, T. E. (2007). Python for scientific computing. *Comput. Sci. Eng.* **9**, 10-20.
1296 Paul, R., Wollman, R., Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Cimini, D. and Mogilner, A.
1297 (2009). Computer simulations predict that chromosome movements and rotations
1298 accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy. *Proc. Natl.*
1299 *Acad. Sci. USA* **106**, 15708-15713.
1300
1301
1302
- Pearson, C. G., Maddox, P. S., Salmon, E. D. and Bloom, K. (2001). Budding
1303 yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. *J. Cell Biol.* **152**,
1304 1255-1266.
Reyes, C., Serrurier, C., Gauthier, T., Gachet, Y. and Tournier, S. (2015). Aurora
1305 B prevents chromosome arm separation defects by promoting telomere
1306 dispersion and disjunction. *J. Cell Biol.* **208**, 713-727.
Rieder, C. L., Davison, E. A., Jensen, L. C., Cassimeris, L. and Salmon, E. D.
1307 (1986). Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position
1308 relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-
1309 spindle. *J. Cell Biol.* **103**, 581-591.
Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch,
1311 T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B. et al. (2012). Fiji: an
1312 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
1313 kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic
1314 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.
1315 (2008). The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control
1316 mitotic chromosome alignment. *Dev. Cell* **14**, 252-262.
Tischer, C., Brunner, D. and Dogterom, M. (2009). Force- and kinesin-8-
1317 dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics.
1318 *Mol. Syst. Biol.* **5**, 250.
Tournier, S., Gachet, Y., Buck, V., Hyams, J. S. and Millar, J. B. A. (2004).
1319 Disruption of astral microtubule contact with the cell cortex activates a Bub1,
1320 Bub3, and Mad3-dependent checkpoint in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **15**,
1321 3345-3356.
Umesono, K., Toda, T., Hayashi, S. and Yanagida, M. (1983). Cell division cycle
1322 genes nda2 and nda3 of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control
1323 microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole
1324 compounds. *J. Mol. Biol.* **168**, 271-284.
Unsworth, A., Masuda, H., Dhut, S. and Toda, T. (2008). Fission yeast kinesin-8
1325 Klp5 and Klp6 are interdependent for mitotic nuclear retention and required for
1326 proper microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5104-5115.
Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A. A., Tanaka, T. U. and Howard, J.
1327 (2006). Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent
1328 manner. *Nat. Cell Biol.* **8**, 957-962.
Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S. and Howard, J. (2009). Kinesin-8
1329 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule
1330 depolymerization. *Cell* **138**, 1174-1183.
Vladimirov, E., Harry, E., Burroughs, N. and McAinsh, A. D. (2011). Springs,
1331 clutches and motors: driving forward kinetochore mechanism by modelling.
1332 *Chromosome Res.* **19**, 409-421.
Vladimirov, E., McHedlishvili, N., Gasic, I., Armond, J. W., Samora, C. P.,
1333 Meraldi, P. and McAinsh, A. D. (2013). Nonautonomous movement of
1334 chromosomes in mitosis. *Dev. Cell* **27**, 60-71.
Wandke, C., Barisic, M., Sigl, R., Rauch, V., Wolf, F., Amaro, A. C., Tan, C. H.,
1335 Pereira, A. J., Kutay, U., Maiato, H. et al. (2012). Human chromokinesins
1336 promote chromosome congression and spindle microtubule dynamics during
1337 mitosis. *J. Cell Biol.* **198**, 847-863.
West, R. R., Malmstrom, T., Troxell, C. L. and McIntosh, J. R. (2001). Two related
1338 kinesins, klp5+ and klp6+, foster microtubule disassembly and are required for
1339 meiosis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3919-3932.
West, R. R., Malmstrom, T. and McIntosh, J. R. (2002). Kinesins klp5(+) and
1340 klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *J. Cell Sci.* **115**,
931-940.
Wühr, M., Dumont, S., Groen, A. C., Needleman, D. J. and Mitchison, T. J.
1341 (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
1342 chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in
1343 fission yeast. *EMBO J.* **22**, 2284-2296.
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364

Summary: Quantitative analysis in *S. pombe* reveals that chromosome oscillations are dispensable for kinetochore congression in mitosis. Kinesin-8 controls chromosome congression through length-dependent pulling forces.

2.2 Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase

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

- parler de la détection par deflation (implementation trop lente?)
- parler de l'algo de jaquaman et de scikit tracker : echec de l'algo probablement du à une détection trop mauvaise et pas à l'algo de tracking

2.2.2 Traitement des trajectoires par des techniques d'analyse du signal

- parler des techniques utilisées dans le papier et des problemes qu on a eu

2.2.3 Peut-on inférer l'état d'attachement par l'analyse de la trajectoire ?

- broder un truc (probablement avec du data-driven bla bla bla)

2.2.4 Analyse du mouvement des chromosomes par des approches bayésiennes

- broder aussi un truc avec des MSD toussa toussa

2.3 Modélisation bio-mécanique du fuseau mitotique

2.3.1 Un modèle de congression alternatif

2.3.2 Vers un modèle d'attachement à trois états

3

Discussion

- 3.1 Le mouvement des chromosomes durant la mitose**
- 3.2 Le mécanisme d'alignement des chromosomes : de l'*in silico* à l'*in vivo***
- 3.3 Modéliser la mitose : jusqu'à quelle précision ?**

A

Annexes

A.1 Annexe 1 : bla bla bla bla

Bibliographie

- Armond, J.W., Vladimirou, 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.
- 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.
- Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 33–46.
- Cimini, D., Wan, X., Hirel, C.B., and Salmon, E.D. (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Current Biology : CB* 16, 1711–1718.
- 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.
- 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.

Fu, C., Ward, J.J., Loiodice, I., Velve-Casquillas, G., Nedelec, F.J., and Tran, P.T. (2009). Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation. *Developmental Cell* 17, 257–267.

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

Garcia, M.A., Koonrugs, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

Jaqaman, K., King, E.M., Amaro, A.C., Winter, J.R., Dorn, J.F., Elliott, H.L., Mcchedlishvili, 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 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.

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.

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

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.

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.

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

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).

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

Marshall, W.F., Marko, J.F., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (2001). Chromosome elasticity and mitotic polar ejection force measured in living *Drosophila* embryos by four-dimensional microscopy-based motion analysis. *Current Biology* 11, 569–578.

Mayr, M.I., Hügger, 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.

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

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.

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.

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.

Reese, L., Melbinger, A., and Frey, E. (2014). Molecular Mechanisms for Microtubule Length Regulation by Kinesin-8 and XMAP215 Proteins. *ArXiv Preprint ArXiv:1405.5847* 4, 1–21.

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.

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.

Sivakumar, S., and Gorbsky, G.J. (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nature Publishing Group* 16, 82–94.

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 tension. *Journal of Cell Science* 108 (Pt 7), 2537–2548.

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.

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.

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

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.

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.

Watson, J.D., Crick, F.H.C., and Others (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* *171*, 737–738.

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.

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., 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.

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. *The EMBO Journal* 22, 2284–2296.

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.